

FÁBIO LOPES DE QUEIROZ

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES GÊNICAS E DA PLOIDIA
EM TUMORES COLORRETAIS**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS
BRASIL – 2000

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

FÁBIO LOPES DE QUEIROZ

**ESTUDO DE ALTERAÇÕES GÊNICAS E DA PLOIDIA
EM TUMORES COLORRETAIS**

Dissertação apresentada ao Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marisa Bianco
Bonjardim

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA GERAL – GENÉTICA
BELO HORIZONTE – MINAS GERAIS
BRASIL – 2000

À minha mãe Terezinha Lopes pelo exemplo de persistência, determinação e dedicação aos filhos;

Aos meus irmãos Fabiana e Fabrício, apoio constante e fonte de inspiração e alegrias dando mais sentido às nossas vidas;

À minha noiva Vívian por suportar as longas horas de ausência durante a realização desta dissertação, e por estar sempre presente em meus pensamentos amenizando as dificuldades do dia-a-dia, bem como pelo auxílio inestimável na elaboração deste projeto;

Ao meu pai pelo incentivo ao estudo na minha infância.

AGRADECIMENTOS

À Deus por permitir condições para a realização deste projeto.

À Prof^ª Dr^ª Marisa Bianco Bonjardim

Agradeço pela orientação segura e impecável, pelo incentivo e entusiasmo na realização desta dissertação bem como pelo profissionalismo, competência e entusiasmo científico que desde o início, soube aplicar às nossas atividades.

Agradeço pela habilidade em saber lidar durante a elaboração de todos os nossos trabalhos, incluindo a obtenção de créditos, experimentos e elaboração da dissertação, com as dificuldades inerentes ao fato de eu já atuar na prática clínica e apresentar horários irregulares e muitas vezes aquém do necessário para o desenvolvimento das atividades em tempo hábil, estendendo nossas atividades além do previsto; pelo discernimento em entender os esforços envidados por ambas as partes, na realização do nosso projeto, dada a importância pessoal da realização do mesmo para cada um de nós, administrando as regras da instituição, sem desobedecê-las, mas sem transformá-las em ansiedade que prejudicassem nossas atividades.

Agradeço ainda pela maturidade e paciência no exercício da relação professor aluno, por ser ponderada, compreensível e disponível, mas sabendo ser enérgica nas horas necessárias, proporcionando estímulo e apoio nos momentos de dificuldade e muitas vezes até mesmo de desânimo.

Agradeço também pela atuação direta da Prof^ª Marisa no estabelecimento das condições e metodologias no laboratório, específicas para o material que estávamos iniciando a trabalhar, o que demandou muito tempo e experimentos, muitos deles realizados com seu esforço pessoal o que ultrapassava as atribuições de orientadora, alcançando o campo do coleguismo e da solidariedade.

Ao Dr. Hélio Teixeira dos Santos

Agradeço pelo apoio amplo e incondicional ainda quando esta dissertação era apenas um projeto, bem como pelo exemplo de profissionalismo, caráter, solidariedade, entusiasmo e principalmente pelo esforço, sempre constante, que não se apagaram ao longo dos anos de exercício clínico, com o bem estar e cuidados especiais dispensados aos seus pacientes. O que temos aprendido e tentado literalmente imitar, no decorrer destes anos que estamos trabalhando juntos.

Agradeço também pela compreensão e apoio, inclusive financeiro, durante estes 2 anos e meio da realização desta dissertação nos quais necessitei ausentar-me de muitas das atividades do serviço, bem como da menor disponibilidade para ajudar nas atividades diárias da clínica coloproctológica do Hospital Felício Rocho.

À minha família pelo apoio, suporte e agradável convivência ao longo dos anos.

Ao tio Túlio e tia Lourdinha pelo apoio desde o início da minha formação, bem como pelo exemplo de perseverança e objetividade.

À Prof^ª Dr^ª Cleusa Graça da Fonseca, coordenadora do curso de Pós-Graduação em Genética, pela clareza, organização e enlevado espírito científico com que conduz o curso.

Aos professores do departamento de Genética pelo incentivo e consideração a mim dispensados, bem como, por acreditarem que, mesmo frente a todas as dificuldades, conseguiríamos concluir o projeto de dissertação.

Aos professores José Miguel Ortega e Fabrício Rodrigues dos Santos pelas aulas ministradas durante o curso e pelo entusiasmo científico.

Aos colegas de Pós-Graduação e agora Mestres Maria Dulce, Daniela, Anderson, Isabel, Micheline e Alessandra pela boa vontade e paciência em me ajudar nas diversas atividades técnicas e científicas.

Ao Dr. Marcelo Vidigal Caliari pela disponibilidade e ajuda na procura de horários na Morfometria.

Aos colegas do Laboratório de Apoptose, Glauco e Jairo, pela disponibilidade para o uso do aparelho de Morfometria.

À Prof^ª Dr^ª Mary Armelin pela gama de ensinamentos durante seu curso em São Paulo, ao qual tive acesso.

Ao colega de laboratório, hoje médico, Renato Natalino, pela valiosa ajuda em experimentos, preparo de materiais e análise de dados.

Aos preceptores da Residência de Cirurgia Geral, Dr. Cláudio Almeida Oliveira, Dr. Antonio Sérgio Alves, Dr. Álvaro Vieira Júnior, Dr. José Luís Campelo de Melo Viana e Dr. Marcos Martins, pelo exemplo de competência e profissionalismo.

Aos preceptores da Residência de Coloproctologia, Dr. Victor Fillizola, pelos ensinamentos, pela visão especial e interessante da vida, e pelas tiradas sempre espirituosas; Dr. Paulo César de Carvalho Lamounier pelos ensinamentos e exemplo de profissionalismo; e Dr. Valdivino Alves Filho pelos ensinamentos, exemplo de desprendimento, solidariedade e humanidade.

À Dr^a Eliane Sander Mansur pelos ensinamentos, entusiasmo e por proporcionar agradáveis conversas e discussões, sejam de temas científicos ou assuntos diversos, tal a mente brilhante que possui.

Ao Dr. Antônio Lacerda Filho pelos constantes e renovados ensinamentos que se estendem além do término da minha residência, mas principalmente, pelo entusiasmo, incentivo e apoio às atividades científicas e à preocupação de proporcionar aos pacientes os melhores e mais atualizados cuidados médicos.

Ao Dr. Wilson Luis Abrantes pelo incentivo à pesquisa e pela participação na minha formação cirúrgica.

Ao Dr. Domingos André F. Drumond pelo enlevado espírito científico, profissionalismo e participação na minha formação cirúrgica.

À amiga e companheira de consultório, Dr^a Maria Zuleime Carmona, pelos conselhos e cuidados a mim dispensados, bem como, pela árdua tarefa de organizar sozinha as questões relativas ao consultório, de forma tão correta e zelosa, durante o período de preparação desta dissertação. Pela grande disponibilidade, solidariedade e, pelo fato de que, conhecendo-me tão bem, ter me ajudado tanto em difíceis decisões.

Aos colegas de Residência que transformaram-se em grandes amigos, Dr. Agnaldo Eisenberg, Dr^a Maria Cristina Furtado e Dr. Marcelo Wagner Farah.

Aos amigos e colegas de trabalho, Dr. Rodrigo Romualdo Pereira, Dr. Fernando Vasconcelos, Dr. Sandro Chaves e Dr. Luiz Carlos Gomes Rocha, pelo incentivo e apoio bem como, pela disponibilidade para as freqüentes trocas de plantão, principalmente durante a elaboração desta dissertação.

Aos residentes de Coloproctologia do Hospital Felício Rocho, Dr^a Silvia Quick Doll, Dr. Antônio Hilário e Dr. Renato Azevedo, pelo apoio constante e pelos cuidados dispensados aos meus pacientes, como se deles fossem, nas evoluções diárias e nas diversas vezes em que necessitei estar ausente.

Aos residentes da Cirurgia Geral do Hospital Governador Israel Pinheiro, Sandro Henrique, Frederico Lins, Kelly Cristina, Leonardo Durães, Andrea Disciaciati, Raquel Virgínia, Perla Sawaski, Emerson Melgaço, Emerson Lopes, Hélio Antônio, Leopoldo, Ricardo, Eliana, Alexandre e Lúcio, fonte constante de entusiasmo, enriquecimento científico e fonte inesgotável de questionamentos, que nos mantêm em constante renovação. Pelo cuidado especial e dedicação aos meus pacientes e pelo auxílio nos levantamentos bibliográficos.

Aos residentes Cintia Mundim e Bruno César pelo auxílio nos levantamentos bibliográficos e cuidados especiais com os pacientes, além das agradáveis conversas durante as horas de cirurgia e/ou plantões.

Ao Dr. Rodrigo Moreialvar pela grande integração durante as nossas atividades na clínica cirúrgica com os pacientes e, nas atividades científicas, pelo exemplo de competência e humanidade no trato com os colegas e pacientes, além do auxílio indispensável na coleta de dados e material cirúrgico.

À residente da Coloproctologia do Hospital Governador Israel Pinheiro, Luciana Freire Goulart, pelo cuidado com os pacientes e pelas proveitosas discussões sobre nossos diferentes pontos de vista da vida profissional.

Aos amigos Magda Profeta da Luz, companheira constante ao longo dos anos no exercício da profissão, ouvinte e conselheira ponderada em relação aos problemas do dia-a-dia e, fonte inesgotável de apoio e incentivo; e Dr. Rodrigo Gomes da Silva, mente questionadora e entusiástica do conhecimento médico, bem como, exemplo de retidão, organização e competência que muito me incentivaram.

Ao amigo e colega de Residência Dr. Ramon Pires Maranhão pelas proveitosas discussões, e agradáveis, embora raras, horas de lazer junto à minha noiva e sua esposa Ívina.

Ao Dr. Eudes Arantes, chefe do serviço de Cirurgia Geral do Hospital Governador Israel Pinheiro, pelo apoio e exemplo de profissionalismo.

A Dr^a Luciana Pyrâmo, chefe da Coloproctologia do Ipsemg, que me apoiou durante a realização deste projeto e, pelo exemplo de competência, profissionalismo e capacidade de liderança.

Ao Dr. Paulo Guilherme, que conheci durante a realização deste projeto, e que tornou-se grande amigo e pessoa fundamental, ajudando-me sem restrições no preparo de lâminas e análises microscópicas, bem como, em discussões sobre o assunto.

Ao Dr. Carlos Eduardo Bacchi pelo auxílio na realização das imuno-histoquímicas.

Aos colegas do laboratório, Cristiane, Gladston e Anderson, pela disponibilidade na ajuda das atividades práticas e experimentais.

À Erica Queiroz, colega do laboratório, sem a qual este projeto não seria o mesmo, e que representa durante a sua graduação, exemplo de entusiasmo e brilhante pesquisadora em formação, além da disponibilidade e solidariedade para a realização dos experimentos.

À secretária Marina, da Pós-Graduação, sempre disponível para ajudar nas questões inerentes ao curso, e que dispensou-me cuidados especiais na secretaria do Departamento.

Às secretárias Isabel e Bete que tantos problemas resolveram de forma eficiente na minha ausência, bem como pela boa vontade quando necessitei de seus préstimos.

Ao Departamento de Biologia Geral – Genética – pela oportunidade de realizar este estudo.

As Comissões de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, do Hospital Felício Rocho e Hospital Governador Israel Pinheiro por entender os objetivos de nossa pesquisa aprovando sua realização.

Aos Hospitais Felício Rocho e Governador Israel Pinheiro por permitir a realização deste estudo.

Aos pacientes, envolvidos neste estudo, que entenderam o seu objetivo, refletindo ato de humanidade e desejo de contribuir com a ciência e com o bem estar do próximo.

RESUMO

O câncer colorretal devido a algumas peculiaridades como a seqüência adenomacarcinoma e à sua alta prevalência tem sido fonte de intensos estudos e avanços da genética e da biologia molecular. Cada vez mais busca-se uma caracterização histopatológica mais precisa e marcadores genéticos e biológicos para se estratificar melhor os diferentes tumores para que se possa prever com maior precisão o comportamento tumoral.

Desde o estabelecimento do modelo inicial da tumorigênese proposto por Fearon e Vogelstein envolvendo os oncogenes, genes supressores de tumor e posteriormente a descoberta dos genes de reparo, muitas características e alterações biológicas têm sido sugeridas para se avaliar diferentes comportamentos tumorais.

Alguns estudos têm demonstrado que podemos distinguir duas classes de tumores com comportamento biológico diferentes. Por um lado temos aqueles com instabilidade de microssatélites, ausência de acúmulo de p53 na célula, pouco diferenciados, mais comuns à direita e que se comportam de forma semelhante aos tumores dos pacientes portadores da polipose colônica familiar de forma mais agressiva.

Estes dados são ainda motivo de controvérsia e procura-se estabelecer as relações entre esses fatores, com os já tradicionalmente usados, bem como o prognóstico e achados histopatológicos relacionados com a agressividade do tumor, como estadiamento e grau de diferenciação histológica, além de outros parâmetros clínicos.

Neste estudo avaliamos em 29 pacientes o valor da ploidia medida indiretamente pela Morfometria Digital Computadorizada, padronizando técnica adequada para estudo das células da mucosa colônica.

Avaliamos a instabilidade do microssatélite D17S855, a reação de imuno-histoquímica para p53, a ampliação/deleção de c-myc através de hibridização com sonda radioativa.

Em seguida avaliamos a freqüência dessas alterações na população analisada e as relações desses parâmetros entre si e com variáveis clínicas e histopatológicas como idade, sexo, níveis de CEA, estadiamento do tumor e grau de diferenciação histológica.

Houve uma freqüência de aneuploidia de 40,9%. O c-myc estava amplificado em 7,6% e com um valor abaixo do normal em 46,1%. O acúmulo de p53 com reação de imuno-histoquímica positiva foi de 50% dos pacientes. O microssatélite D17S855 não apresentou instabilidade nas amostras estudadas. Houve uma associação entre valor da ploidia aumentada com tumores mais iniciais e valores mais baixos com tumores mais avançados. Verificou-se

uma associação positiva, correlação Pearson com $r = 0,40$, $P = 0,0064$ entre aneuploidia e valores da amplificação do c-myc.

Além disso houve uma associação entre idade maior que 50 anos e alteração do c-myc. Tumores do cólon esquerdo estiveram mais freqüentemente associados com p53 e c-myc alterados, embora essas diferenças não tenham alcançado significado estatístico. Não houve associação das variáveis analisadas com idade, sexo, grau de diferenciação histológica e níveis de CEA.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Teoria da evolução clonal das células tumorais.	31
Figura 2.	Representação esquemática da interação entre oncogenes, genes de reparo, genes supressores de tumor, genes envolvidos na apoptose e no “checkpoint” do ciclo celular.	32
Figura 3.	Modelo proposto por Fearon e Vogelstein (1990) para a tumorigênese colorretal.....	33
Figura 4.	Representação das alterações histopatológicas no desenvolvimento dos tumores colorretais.	33
Figura 5.	Representação esquemática do possível mecanismo de ação do p53, conforme modelo apresentado por Lane (1992).....	39
Figura 6.	Representação esquemática de modelo para reconhecimento de erros de pareamento do DNA e seu reparo.....	44
Figura 7.	Modelo de derrapagem “strand slippage” durante a replicação do DNA.....	45
Figura 8.	Heredograma da família dos pacientes 3 (III-6) e 30 (III-3) com FAP.....	52
Figura 8A e 8B –	Carcinoma colorretal. Avaliação da ploidia mostrando células bem coradas e isoladas.....	56
Figura 9.	Eletroferograma de digestões do plasmídeo pMC413	64
Figura 10.	Carcinoma colorretal – caso 1 – Amostra com alto percentual de células neoplásicas HE 40X.....	79
Figura 11.	Carcinoma colorretal – caso 6 – Amostra com cerca de 40% de células tumorais e com abundante tecido desmoplásico HE 40X.....	80
Figura 12.	Carcinoma colorretal – caso 4 – pequenas áreas de tecido tumoral envolvido por tecido normal, tornado a microdissecção muito difícil, sendo a mesma desprezada.	81
Figura 13.	Autorradiografia mostrando a intensidade da marcação do DNA de tecido normal e tumoral pela hibridização com sonda para c-myc.....	88
Figura 14.	Eletroferograma dos produtos de PCR resolvidos em gel de acrilamida 8% e corado pela prata.....	92
Figura 15.	Caso “0”– Carcinoma colorretal de imuno-histoquímica positiva para p53.....	93

Figura 16. Caso 5 – Lâmina de amostra de tecido tumoral mostrando reação de imuno-histoquímica negativa para p53.	94
Figura 17. Caso 19 – Lâmina de amostra de tecido tumoral mostrando reação de imuno-histoquímica fracamente positiva para p53.	95

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.	Relação entre as classificações de Dukes, Astler-Coller e TNM.	27
Tabela 2.	Apresentação dos dados clínicos e estadiamento dos pacientes.	51
Tabela 3.	Concentração sugeridas para reação de PCR.....	66
Tabela 4.	Apresentação de relação entre as variáveis analisadas, dados clínicos e histopatológicos.....	76
Tabela 5.	Análise comparativa do estágio com relação à ploidia.....	82
Tabela 6.	Avaliação da ploidia em 22 amostras, comparando-se o valor da ploidia com o histograma correspondente.	86
Tabela 7A.	Valores obtidos para a marcação de c-myc nas amostras pareadas de tecido tumoral e normal.	62
Tabela 7B.	Valores obtidos pela relação tecido tumoral/tecido normal para hibridização de c-myc.....	89
Tabela 8.	Resultado da imuno-histoquímica para p53.....	91
Tabela 9.	Análise comparativa do sexo com relação à variável myc.	96
Tabela 10.	Análise comparativa das medidas da ploidia com relação às variáveis de interesse.	97
Tabela 11.	Análise comparativa das medidas do myc com relação às variáveis de interesse.....	98
Tabela 12.	Análise comparativa das medidas do p53 com relação às variáveis de interesse.....	99
Tabela 13.	Análise da correlação entre as medidas do myc e da ploidia.....	100
Tabela 14.	Análise comparativa do myc com o p53.....	101
Tabela 15.	Análise comparativa do myc com a ploidia.	101
Tabela 16.	Análise comparativa do p53 com a ploidia.....	101

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1. Caracterização dos casos com relação ao sexo.	77
Gráfico 2. Caracterização dos casos com relação à faixa etária.	77
Gráfico 3. Caracterização dos casos com relação à localização.	77
Gráfico 4. Caracterização dos casos com relação ao estágio.....	78
Gráfico 5. Caracterização dos casos com relação ao grau de diferenciação histológica.	78
Gráfico 6. Caracterização dos casos com relação ao CEA.....	78
Gráfico 7. Análise comparativa do estágio com relação à medida da ploidia.....	82
Gráfico 8. Análise do conteúdo de DNA em amostras de carcinoma colorretais utilizando citometria estática	83
Gráfico 9. Caso controle – tecido normal – histograma normal com distribuição da grande maioria das células em torno de 2C. Representa o padrão verificado nas células de tecidos normais	84
Gráfico 10. Histograma tipo I – Caso 6 tumor – pico modal único na região 2C com poucas células se desviando do normal	84
Gráfico 11. Histograma tipo II – Caso 19 tumor – valor modal próximo à região tetraplóide além do pico ao redor de 2C.....	85
Gráfico 12. Histograma tipo III – Caso 8 tumor – apresenta dois picos, mas difere do tipo II pelo desvio dos valores 2C e 4C.....	85
Gráfico 13. Histograma tipo IV – Caso 7 tumor – histograma com evidência de pronunciada e irregular aneuploidia com quantidade de DNA por célula variando de níveis próximos a 2C à valores próximos a 6C ou mesmo 8C.....	85
Gráfico 14. Caracterização dos pacientes quanto ao resultado da hibridização do c-myc.....	89
Gráfico 15. Caracterização das variáveis c-myc com relação à média de idade.....	96
Gráfico 16. Análise de correlação das medidas de ploidia e c-myc.....	100

LISTA DAS ABREVIATURAS

FAP	Familial Adenomatous Poliposis (Polipose Adenomatosa Familiar)
HNPCC	Hereditary NonPoliposis Colorectal Cancer (Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo)
FCC	Familial Colorectal Cancer (Câncer Colorretal Familiar)
DNA	Desoxiribonucleic Acid (Ácido Desoxirribonucleico)
GTBP	G-T Binding Protein (Proteína Ligadora G-T)
CEA	Carcino Embriogenic Antigen (Antígeno Cárcino Embriogênico)
AJCC	American joint Committee on Cancer
TNM	Classificação Patológica – T (Tumor), N (Nódulo – Linfonodo), M (Metástase)
A,B,C,D.	Letras correspondentes aos estádios de Dukes para adenocarcinoma de cólon
HSR	homogenous Staining Regions (Regiões Homogeneamente Coradas)
hMSH2	Gene Humano Homólogo ao MutS
hMLH1	Gene Humano Homólogo ao MutL
APC	Gene “Adenomatous Poliposis Coli”
PTEN	Gene “Protein Tyrosine Phosphatase”
DCC	Gene “Deleted in Colon Cancer”
p21	Gene p21
p53	Gene p53
LI	Labeling Index (Índice de Marcação)
DI	DNA Index (Índice de DNA)
MIN (-)	Microsatellite Instability (-) (Ausência de Instabilidade de Microsatélite)
MIN (+)	Microsatellite Instability (+) (Presença de Instabilidade de Microsatélite)
MRS	Mismatch Repair System (Sistema de Reparo dos Erros de Pareamento de DNA)
RER (-)	Replication Error Repetitions (Ausência de Erros de Replicação)
RER (+)	Replication Error Repetitions (Presença de Erros de Replicação)
SSCP	Single-Stranded Conformation Polymorphism
RAPD	Random Amplification Polymorphism DNA
TE	Tampão Tris-EDTA
TBE	Tampão Tris-Borato-EDTA

EDTA Ethilen Diamino Tetra Acetic Acid

Colon D Colon Direito

Colon E Colon Esquerdo

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	20
1.1	Classificação dos tumores colorretais quanto à forma de herança.....	22
1.1.1	FAP (Familiar Adenomatous Poliposys).....	22
1.1.2	HNPCC (Hereditary NonPolisys Colorectal Carcinoma)	23
1.1.3	FCC (Familiar Colorectal Carcinoma)	23
1.1.4	Síndrome da polipose juvenil.....	23
1.1.5	Tumores esporádicos.....	24
1.2	Estádios do câncer colorretal	26
1.3	Câncer como doença genética.....	27
1.4	Alterações genéticas em oncogenes no câncer colorretal.....	29
1.4.1	Amplificação do c-myc em tumores colorretais	34
1.4.2	Perda alélica e genes supressores de tumor	35
1.4.2.1	Estudo do p53 por Imuno-histoquímica no câncer colorretal.....	36
1.4.3	Instabilidade de microssatélites e genes de reparo.....	38
1.4.4	Outras alterações somáticas – ploidia do DNA	42
2.	OBJETIVOS	48
2.1	Objetivo geral.....	48
2.2	Objetivos específicos.....	48
3.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	49
3.1	Pacientes	49
3.2	Coleta e armazenamento das amostras	53
3.3	Preparo das lâminas para análise microscópica	53
3.4	Preparo das lâminas para análise de ploidia	54
3.4.1	Coloração pelo feulgen.....	57
3.5	Digestão das amostras e extração do DNA.....	57
3.6	Quantificação do DNA – após extração	58
3.7	Avaliação da amplificação do c-myc	59
3.7.1	Preparo das membranas para “slot blot”.....	59
3.7.2	Preparo das sondas	60
3.7.3	Hibridização	61
3.7.4	Leitura das autorradiografias	61

3.7.5	Minipreparação de plasmídio de bactérias (lise alcalina).....	63
3.7.6	Digestão com enzimas de restrição	63
3.7.7	Purificação de DNA em Gel de agarose (Geneclean)	65
3.7.8	Confecção do Gel de agarose 0,8%.....	65
3.8	Instabilidade do microssatélite D17S855	66
3.8.1	Confecção do Gel de poliacrilamida	67
3.8.2	Coloração pela prata	68
3.9	Imuno-histoquímica para p53	68
3.9.1	Preparação das lâminas silanização.....	69
3.9.2	Revelação e montagem	70
3.10	Soluções e reagentes.....	70
4.	RESULTADOS.....	75
4.1	Avaliação da ploidia do DNA.....	83
4.2	Extração do DNA	86
4.3	Amplificação do c-myc	86
4.4	Instabilidade do microssatélite D17S855	90
4.5	Imuno-histoquímica para p53	90
5.	DISCUSSÃO	102
6.	CONCLUSÕES.....	116
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	118

1. INTRODUÇÃO

Nas duas últimas décadas o conhecimento da fisiopatologia do câncer colorretal sofreu uma revolução que foi de igual interesse para os pesquisadores básicos e os clínicos. Descortinaram-se novos horizontes na compreensão da patogênese dos tumores humanos, que deram origem a um entendimento mais completo da biologia da célula, assim como a um maior discernimento no que concerne à predisposição genética para o câncer (Miltenburg et al., 2000; Carethers et al., 1996).

Os tumores colorretais têm grande impacto social e econômico na população, sendo a segunda causa de óbitos por câncer nos Estados Unidos com 150.000 novos casos diagnosticados e aproximadamente 60.000 mortes relatadas a cada ano, no Brasil, o INCA prevê para o ano de 2000 cerca de 13.400 novos casos de câncer de colon e reto e 6.700 mortes devidos a essa causa (INCA [http//](#)).

A grande maioria, cerca de 95%, dos cânceres colorretais são adenocarcinomas, outras formas mais raras são os tumores carcinóides, tumores estromais gastrointestinais e linfomas (ACS [http//](#)). O adenocarcinoma colorretal desenvolve-se lentamente ao longo dos anos e manifesta-se por meio de uma seqüência de eventos que deixam um rastro de lesões patológicas a serem estudadas, permitindo o estabelecimento de relações entre as alterações genéticas, moleculares e as histológicas. Nesse processo de desenvolvimento dos tumores colorretais a lesão mais precoce identificável é o pólip adenomatoso que se caracteriza pelo crescimento de tecido para dentro da luz do órgão.

Os pólipos colônicos de uma forma geral, sob o ponto de vista histológico, podem ser classificados como neoplásicos, não neoplásicos e submucosos. Os neoplásicos são os adenomas e os pólipos malignos. Os não neoplásicos incluem os hiperplásicos, pseudopólipos inflamatórios e os hamartomatosos que por definição não são capazes de progredir para carcinoma. Já os pólipos submucosos são incomuns e o potencial maligno é determinado pela histologia subjacente, esses incluem nódulos linfóides, lipomas leiomiomas e tumores carcinóides (Gordon, 1999).

O pólip adenomatoso, também chamado simplesmente de adenoma, foi motivo de intensos estudos abrindo uma nova era na história da tumorigênese tendo sido identificados muitos dos genes considerados responsáveis pela progressão da mucosa colônica normal para carcinoma através do estudo da denominada seqüência adenoma-carcinoma.

Sabe-se que a mucosa colônica normal renova-se a cada seis dias por proliferação e diferenciação celular a partir das células localizadas na base das criptas das glândulas da mucosa do cólon. O terço inferior dessas criptas funciona como um compartimento de proliferação celular e migração ascendente de células a partir daquelas ancoradas na sua base. A medida que ocorre essa migração celular da base para o ápice da cripta ocorre diferenciação e maturação das mesmas sendo que estas perdem sua capacidade de se dividir novamente, finalmente morrem e são lançadas na luz do cólon (Carethers et al., 1996; Luk, 1995).

Na formação dos adenomas essa seqüência é profundamente alterada. Ocorrem mitoses contínuas e ausência de diferenciações das células, logo a replicação persistente de células próximas à superfície da cripta juntamente com a maturação e extrusão tardia das células, não havendo a morte celular na freqüência usual leva a um pregueamento para baixo das células epiteliais, o que será responsável por sua interposição e ramificação entre os elementos normais da cripta. Esse processo leva ao padrão glandular de ramificação que é observado nos adenomas tubulares. Com o crescimento dos pólipos pode haver um aumento no crescimento do mesênquima subjacente. Essa proliferação mesenquimal até o nível epitelial, estabelece condições que permitem um crescimento epitelial ainda maior, com a formação de longas projeções digitiformes dos elementos glandulares caracterizando o adenoma viloso. Os adenomas tubulares são, por definição, aqueles que possuem menos de 25% de conteúdo viloso e os adenomas vilosos aqueles com mais de mais de 75%. Já os que tem uma composição intermediária de 25 a 75% de conteúdo viloso são chamados túbulo-vilosos O potencial de transformação maligna em adenocarcinoma é diretamente proporcional à quantidade de material viloso e ao tamanho do pólipo (Luk, 1995).

O adenoma é uma neoplasia benigna, com alta prevalência na população, cerca de 30% das pessoas aos 50 anos e 60% a 65% aos 70 anos têm pólipos, sendo que a maioria deles não evolui para neoplasia. Em um pequeno número de casos, o câncer pode originar diretamente de alterações na mucosa colônica plana, representando uma situação rara de conversão maligna que apareceu precocemente na história natural da tumorigênese colorretal. Apesar disso, admite-se hoje que a maioria dos adenocarcinomas, cerca de 95%, têm origem em adenomas prévios tanto nas formas esporádicas quanto nas familiares. Sabe-se que, cerca de 80% dos tumores colorretais são esporádicos e 20% são herdados como mutação germinativa. As alterações genéticas e moleculares são semelhantes, porém em uma

freqüência diferente, estão presentes em ambas as formas da doença (Miltenburg et al., 2000; Petersen et al., 1991).

1.1 Classificação dos Tumores Colorretais quanto à Forma de Herança

Quanto a esse aspecto os tumores colorretais podem ser considerados familiares ou não. As formas não familiares são representadas pelos adenocarcinomas colorretais esporádicos ou seja quando não há relato de casos na família e as formas familiares de câncer colorretal que incluem a FAP (Familiar Adenomatous Polyposis), HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Carcinoma), FCC (Familiar Colorectal Carcinoma), e a forma associada com a Polipose Juvenil. Essas formas constituem poderosas armas para estudos genéticos e clínicos (Park et al., 1999; Olschwang et al., 1998).

1.1.1 FAP (Familial Adenomatous Poliposys)

É uma síndrome que representa cerca de 5% de todas as formas hereditárias do câncer colorretal e que se caracteriza pela presença de 100 ou mais pólipos adenomatosos no cólon, reto ou em ambos. Geralmente os pólipos aparecem aos 16 anos e os sintomas benignos até em torno dos 30.

O diagnóstico é feito em média aos 35 anos sendo que o câncer ocorre aos 40 anos e quando não tratado a morte em média virá aos 42 anos.

A FAP pode ser acompanhada de manifestações extracolônicas como osteomas da mandíbula e ossos longos, pigmentação da retina, tumores de tecidos moles, tumores desmóides abdominais e neoplasias de estômago, duodeno, região periampular, fígado e tireóide que em conjunto são chamadas de síndrome de Gardner. Quando há associação com meduloblastoma ou glioma, caracteriza-se a síndrome de Turcot. A maioria dos casos de FAP são herdados de uma forma autossômica dominante e, a mutação responsável pela síndrome está localizada no gene supressor de tumor APC (Adenomatous Polyposis Coli) localizado no cromossomo 5. Uma mutação germinativa está presente em 60% a 80% das famílias com FAP e 10 a 25% dos pacientes trata-se de uma nova mutação no APC (Miltenburg et al., 2000; Petersen et al., 1991; Spirio et al., 1998).

1.1.2 HNPCC (Hereditary NonPolyposis Colorectal Carcinoma)

É uma síndrome com padrão autossômico dominante com penetrância de 70% a 80% e responsável por 5 a 10% de todos os casos de tumores colorretais, a média de idade ao diagnóstico é de 42 anos com 30 a 34% de tumores metacrônicos. Diferentemente da FAP a HNPCC não é caracterizada por um grande número de pólipos, mas como no câncer de cólon esporádico o tumor na HNPCC freqüentemente cresce de um adenoma benigno. As mutações genéticas inicialmente identificadas como responsáveis pela síndrome estão localizadas em 5 genes de reparo do DNA que são hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hMSH6/GTBP (Proteína Fixadora G-T), (Lairmore e Norton, 1997; Giardello, 1997; Nicolaidis et al., 1994).

Clinicamente a HNPCC é diagnosticada quando temos 3 indivíduos na mesma família acometidos por câncer colorretal sendo que 1 deles seja parente em primeiro grau dos outros dois, além disso deve haver duas ou mais gerações sucessivas acometidas e 1 paciente acometido deve ter menos de 50 anos. Esses são os critérios de Amsterdã (Box et al., 1999).

1.1.3 FCC (Familial Colorectal Carcinoma)

Cerca de 10 a 15% dos pacientes com tumores colorretais possuem uma história familiar positiva mas não preenchem critérios para FAP ou HNPCC e esses são classificados como tendo câncer colorretal familiar. Geralmente têm história da doença em um ou dois membros da família e os tumores se desenvolvem aos 50 ou 60 anos. Recentemente uma mutação germinativa associada ao APC foi identificado como responsável por muitos casos de FCC (Miltenburg et al., 2000; Park et al., 1999; Laken et al., 1997).

1.1.4 Síndrome da Polipose Juvenil

É uma doença de herança dominante que freqüentemente se apresenta com diarreia, hemorragia e enteropatia perdedora de proteína. É caracterizada pelo desenvolvimento no trato gastrointestinal de pólipos hamartomatosos que possuem uma abundante lâmina própria desprovida de músculo liso e um componente epitelial normal distinguindo-os daqueles que aparecem na polipose adenomatosa ou na síndrome de Peutz-Jeghers. A síndrome da polipose juvenil predispõe ao câncer do trato digestivo e possivelmente de pâncreas. Uma mutação germinativa no gene da proteína tirosina fosfatase, PTEN – Protein Tyrosine Phosphatase

Gene, tem sido implicada na síndrome da polipose juvenil bem como na doença de Cowdem e na síndrome de Bannayan-Zonana (Olschwang et al., 1998).

A doença de Cowdem, uma condição clínica distinta, que acomete pacientes mais idosos, de herança dominante, é caracterizada por um grupo de lesões dermatológicas patognomônicas e hamartomas da mucosa gastrointestinal acompanhada de câncer de mama (30-50% dos pacientes), tireóide (10%), macrocefalia e uma síndrome específica do sistema nervoso central que são considerados critérios maiores de diagnóstico.

A presença de hamartomas gastrointestinais são considerados critérios menores que não estão associados com risco de câncer gastrointestinal.

Já os achados característicos de Bannayan-Zonana, também chamada Bannayan-Riley-Rualcaba, incluem macrocefalia, lipomas, pólipos hamartomatosos intestinais em 45% dos casos, mal formações vasculares, tireoidite de Hashimoto e pontos de pigmentação no pênis, é geralmente descrita em pacientes jovens, ambas associadas com mutação germinativa no gene PTEN (OMIN-153480). Outros genes envolvidos são os SMAD4 e DCC4 no cromossomo 18 (Olschwang et al., 1998; Nelen et al., 1997; Li et al., 1997; Riggins et al., 1997; Zhou et al., 1999; Rustgi, 1996).

1.1.5 Tumores Esporádicos

Os tumores esporádicos como já foi dito representam cerca de 80% dos casos de câncer colorretal, geralmente aparecem em uma idade mais avançada com um pico na sétima década de vida, mas podendo ser visto em pacientes na segunda ou terceira década. São mais comumente localizados no cólon esquerdo sendo que nos últimos 50 anos têm-se observado uma gradual e lenta migração da frequência de ocorrência em direção ao cólon direito. A prevalência do tumor de cólon possui uma distribuição geográfica variável sendo mais frequente em países ocidentais como Escócia, Nova Zelândia, Dinamarca, Hungria (Gordon, 1999).

De uma forma geral a mortalidade do câncer colorretal tem diminuído ao longo dos anos com uma taxa de diminuição de 29% dos anos 50 para os anos 90, sendo que essa taxa foi maior nas duas últimas décadas, o que pode ser atribuído a um maior número de casos diagnosticados mais precocemente, melhoria no tratamento e, até mesmo, diminuição do número de novos casos em algumas áreas.

A taxa de sobrevivência em 5 anos para pacientes com tumores colorretais em estágio precoce é em torno de 92%, embora somente 37% sejam diagnosticados em estágio inicial. Quando o tumor atinge órgãos adjacentes ou linfonodos, a taxa de sobrevivência em 5 anos cai para 64% e, quando há metástase para órgãos distantes como pulmão ou fígado, essa taxa global é de 7% (Gordon, 1999; ACS [http//](http://)).

Na prática clínica, para uma melhor avaliação, o câncer colorretal é estratificado, com bases em critérios histopatológicos em estádios que permitem uma previsão quanto ao prognóstico, e necessidade de tratamentos complementares.

Muitos outros fatores como por exemplo grau de diferenciação do tumor, invasão vascular, invasão linfática e neural, reação linfocitária peritumoral, níveis de CEA (Carcino Embriogenic Antigen) podem ser usados com essa intenção. Os níveis séricos de antígeno carcino embriônico (CEA) são usados geralmente para acompanhamento de recidiva da doença no pós operatório. O relato inicial de um antígeno específico no câncer colônico foi feito por Gold e Freedman (Gordon, 1999) em 1965 e levou a uma nova era no acompanhamento do câncer de cólon, mas não cumpriu totalmente sua promessa expectativa. A molécula do CEA tem uma massa de 180Kda e a família do gene CEA compreende uma sequência de 29 genes em dois grupos no cromossoma 19. Tem sido mostrado que os múltiplos passos envolvidos na tumorigênese criam um campo de efeito que é caracterizado por células epiteliais morfológicamente normais mas biologicamente alteradas, observou-se muito claramente que a expressão de CEA ocorre na mucosa normal adjacente ao carcinoma e que há um gradiente na expressão do CEA que desaparece à medida que se distancia do carcinoma. Ao longo dos anos sugestões para uso do CEA incluíam detecção de tumor, diagnóstico, monitorização, estadiamento e classificação, patologia, localização e indicação de terapia. Os primeiros dados que foram obtidos de pacientes com carcinoma colônico estabelecido foram mais excitantes e promissores, mas em estudos mais extensivos, foram encontrados falsos negativos principalmente em tumores precoces e falsos positivos resultantes de cânceres não entéricos ou outras condições sem malignidade. As concentrações normais vão de 2,5ng/ml até 5,0ng/ml variando de acordo com o método utilizado. É mais frequentemente aumentado em fumantes do que em não fumantes e em pacientes mais idosos que nos mais jovens. O CEA geralmente está elevado em 40% a 70% dos pacientes com tumor de cólon no pré operatório e sua concentração se correlaciona inversamente com o grau de diferenciação do carcinoma e diretamente com o estágio do

tumor. Geralmente está elevado em 95% dos pacientes com tumores bem diferenciados enquanto em menos de 30% daqueles pouco diferenciados (Nakamura, 1996).

O CEA elevado está relacionado com um maior risco de recorrência bem como com uma menor taxa de sobrevida e pior prognóstico (Gordon, 1999; Kyzer et al., 1992).

Já uma elevação do CEA após um tratamento cirúrgico de sucesso tem sido apontado como sinal de recorrência e segundo alguns autores é a melhor técnica não invasiva de detectar recorrência tumoral. Muitos estudos também tem sido realizados para se avaliar esses e outros parâmetros e as diferentes alterações ao nível molecular e genético nos diferentes estádios do câncer colorretal com a finalidade de se estabelecer um paralelo entre eles.

O estadiamento do câncer colorretal é baseado no grau de acometimento das camadas do órgão (mucosa, *muscularis mucosae*, submucosa, muscular própria, serosa, tecidos adjacentes) e na presença de acometimento de linfonodos, órgãos adjacentes e órgãos à distância (Gordon, 1999; Cecilia, Fenoglio-Presser, 1999; ACS [http](http://)).

1.2 Estádios do Câncer Colorretal

Existem vários sistemas para a classificação do estadiamento do câncer colorretal, entre eles temos a classificação original de Dukes que vai de A a C; a qual foi modificada posteriormente por Astler-Coller que vai de A a D e a classificação da American Joint Committee on Cancer para câncer colorretal (AJCC/TNM). Sendo esta última a forma de estadiamento que tem sido mais preconizada, por ser mais informativa e detalhada, embora as anteriores ainda sejam muito utilizadas.

Um tumor é considerado Dukes "A" quando está confinado à parede do órgão, se ultrapassa a serosa ou acomete tecidos adjacentes é dito como Dukes "B" e se existem linfonodos acometidos é Dukes "C". A classificação de Astler-Coller é uma modificação da de Dukes. O estágio A é semelhante. Diz-se que um tumor é "B1" quando ele não ultrapassa a muscular própria do órgão e não há linfonodos acometidos; "B2" se ultrapassa a muscular mas não há linfonodos acometidos e não acomete tecidos adjacentes; "B3" se acomete tecidos adjacentes ou ultrapassa a serosa e não há linfonodos acometidos. "C1", "C2", "C3" corresponde aos estádios "B", em termos de acometimento da parede do órgão, só que com acometimento linfonodal associado e o estágio "D" é quando há metástase à distância como no fígado ou pulmão.

A classificação AJCC/TNM é baseada na infiltração da parede do órgão pelo tumor (T) bem como no acometimento linfonodal (N) e presença de metástase a distância (M), descritos a seguir:

- Estádio 0 – É o câncer em estágio inicial não ultrapassando a mucosa do cólon ou reto, também considerado câncer *in situ*.
- Estádio I – Quando o câncer ultrapassa a mucosa, a muscular da mucosa ou até mesmo a submucosa podendo também acometer a muscular própria do órgão mas não há acometimento de órgãos ou tecidos vizinhos.
- Estádio II – Definido como aqueles casos em que o tumor ultrapassa a muscular própria acometendo tecido adjacente mas ainda não há acometimento em linfonodos.
- Estádio III – É quando ocorre acometimento de linfonodos do mesocolon, por células neoplásicas provenientes do tumor.
- Estádio IV – Nesses casos o tumor atinge órgãos distantes como o fígado, pulmão peritônio, cérebro ou outros.

Uma relação entre estas classificações apresentadas poderia ser simplificada como no quadro abaixo (Gordon, 1999; ACS [http//](http://)).

Tabela 1– Relação entre as classificações de Dukes, Astler-Coller e TNM

AJCC/TNM	Dukes	Astler-Coller
0	–	–
I	A	A, B1
II	B	B2, B3
III	C	C1, C2, C3
IV	–	D

1.3 Câncer como Doença Genética

O estudo dos mecanismos genéticos e moleculares envolvidos nas síndromes hereditárias bem como das alterações em tumores esporádicos e em outras doenças como retinoblastoma, levou à formação de um modelo inicialmente rudimentar para explicar a carcinogênese (Vogelstein e Fearon, 1990; Knudson, 1985).

A teoria atualmente mais aceita é a de que o câncer é uma doença genética resultante do acúmulo de danos no núcleo da célula, esses danos são estavelmente herdados durante a divisão celular de forma que quando uma célula cancerosa se divide, ambas as células filhas são células cancerosas. A divisão de uma célula progenitora cancerosa eventualmente resulta na transformação de um órgão em um fenótipo neoplásico. Nesta linha de raciocínio considera-se que a tumorigênese seja um processo que ocorre em múltiplos passos. A teoria mutacional acredita que neoplasias têm uma composição monoclonal a partir da proliferação de uma célula que sofreu uma mutação e adquiriu uma vantagem proliferativa, pois às vezes, a presença de uma mutação dá à célula uma vantagem de crescimento, permitindo o surgimento de outras células neoplásicas com ondas sucessivas de mutação e crescimento fazendo com que as células do tumor tornem-se o tipo celular predominante constituindo a neoplasia propriamente dita (Lairmore e Norton, 1997; Vogelstein e Fearon, 1990; Vogelstein et al., 1988) (Fig.1). Um modelo para a tumorigênese, a princípio colorretal, mas que pode funcionar como exemplo de tumorigênese em geral, foi apresentado por Vogelstein e Fearon em 1990.

Esse modelo tem sido a base para a formulação de muitos estudos e fonte de pesquisas relacionadas ao câncer. Dados clínicos e fisiopatológicos têm demonstrado, como já citado, que a maioria, senão todos os tumores colorretais, crescem de tumores benignos (adenomas) preexistentes. Mutações em no mínimo 4 ou 5 genes são necessárias para a formação de um tumor maligno.

Embora as alterações genéticas freqüentemente ocorram em uma seqüência preferida, o acúmulo total de mutações, mais do que a ordem em que elas ocorrem, são responsáveis por determinar as propriedades biológicas do tumor. No modelo apresentado por Vogelstein e Fearon (1990) alguns achados evidentes são que os tumores colorretais parecem crescer como resultado de uma ativação mutacional de oncogenes acoplados com inativação mutacional de genes supressores de tumor, estas últimas predominando. Ou seja, um fenótipo maligno resulta de uma mutação em *protooncogenes e genes supressores de tumor* considerados por Vogelstein e *genes de reparo do DNA* descritos posteriormente (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993) (Fig.2).

Protooncogenes funcionam normalmente na célula como promotores do crescimento celular, logo, se um de seus alelos sofrer uma mutação, gerando um oncogene, seu produto poderá interferir no funcionamento do ciclo celular ou levar à perda do controle do mesmo,

podendo contribuir para a formação de uma neoplasia. É importante ressaltar que oncogenes agem em nível celular de forma dominante, ou seja, a mutação em apenas um alelo pode levar a um determinado fenótipo (Miltenburg et al., 2000; Vogelstein et al., 1990).

Genes supressores de tumor (Yeo, 1999) seletivamente inibem o crescimento celular e podem estar envolvidos na apoptose, a morte celular programada. Ao contrário dos oncogenes os dois alelos devem estar mutados para que haja inativação do gene e resulte em uma neoplasia. Knudson (1985) foi o primeiro a propor essa hipótese de dois eventos, “two hits”, para o funcionamento dos genes supressores de tumor, quando descreveu o retinoblastoma. Os produtos dos genes supressores de tumor normalmente regulam o crescimento e a diferenciação celular de uma forma negativa e indiretamente suprimem o desenvolvimento de uma neoplasia, uma vez perdidos ou inativados deixam de exercer o seu papel.

Genes de reparo do DNA formam um sistema que reconhece e repara o DNA danificado. Quando esses genes estão mutados, o DNA danificado não é reparado, e as células acumulam mutações que são transmitidas à seus descendentes podendo ter como resultado aumento na atividade de oncogenes, bem como inativação de genes supressores de tumor, os quais estão diretamente envolvidos no surgimento das neoplasias (Ionov et al., 1993; Peltomaki et al., 1993; Strand et al., 1993).

Há cerca de 20 genes sabidamente envolvidos na carcinogênese colorretal e as mutações genéticas mais bem conhecidas incluem aquelas do gene APC (adenomatous polyposis coli) localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q), p53 localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), DCC no braço longo do cromossomo 18, SMAD4 localizado no braço longo do cromossomo 18; K-ras no braço curto do cromossomo 12 (12p12.1), c-myc e nos genes de reparo hMSH2 (human mutS homolog 2) e hMLH1 (human mutL homolog1) nos braços curtos dos cromossomo 2 e 3 respectivamente e hPMS1, hPMS2 nos cromossomos 2 e 7 além de fenômenos epigenéticos como alteração da metilação (Fig. 3 e 4) (Polakis, 1997).

1.4 Alterações Genéticas em Oncogenes no Câncer Colorretal

Os oncogenes são envolvidos na formação das neoplasias por um mecanismo de ativação que pode ser secundária a uma mutação de ponto, amplificação ou rearranjo, que impliquem em uma expressão aumentada do oncogene. Um importante tipo de mutação somática identificada em tumores colorretais é a do gene *ras*.

Aproximadamente 50% dos carcinomas colorretais e uma percentagem similar de adenomas maiores que 1cm tem mutações no gene *ras*, em contraste essas mutações são encontradas em menos de 10% dos adenomas menores que 1cm. As mutações no gene *ras* podem ser o evento inicial de um conjunto, que leva à formação dos tumores colorretais. Adenomas com mutações no gene *ras* podem ser mais propensos a progredir do que adenomas sem mutação de *ras*. Essas mutações podem ser as responsáveis pela conversão de um pequeno adenoma em um grande e mais displásico, através da expansão clonal de uma célula com mutação (Vogelstein et al., 1990; Bufill, 1990).

Embora a existência de genes amplificados em uma percentagem significativa de tumores tenha sido sugerida pela presença de cromossomos “double minutes” ou por Regiões Coradas Homogeneamente (HSR – Homogenous Staining Regions) em análise de cariótipos, poucos casos específicos de amplificação gênica têm sido relatados. Esses incluem exemplos de amplificações de *neu*, *c-myc* ou *c-myb* em câncer colorretal primário ou células deles derivados (Alitalo et al., 1983; Bonolla et al., 1988).

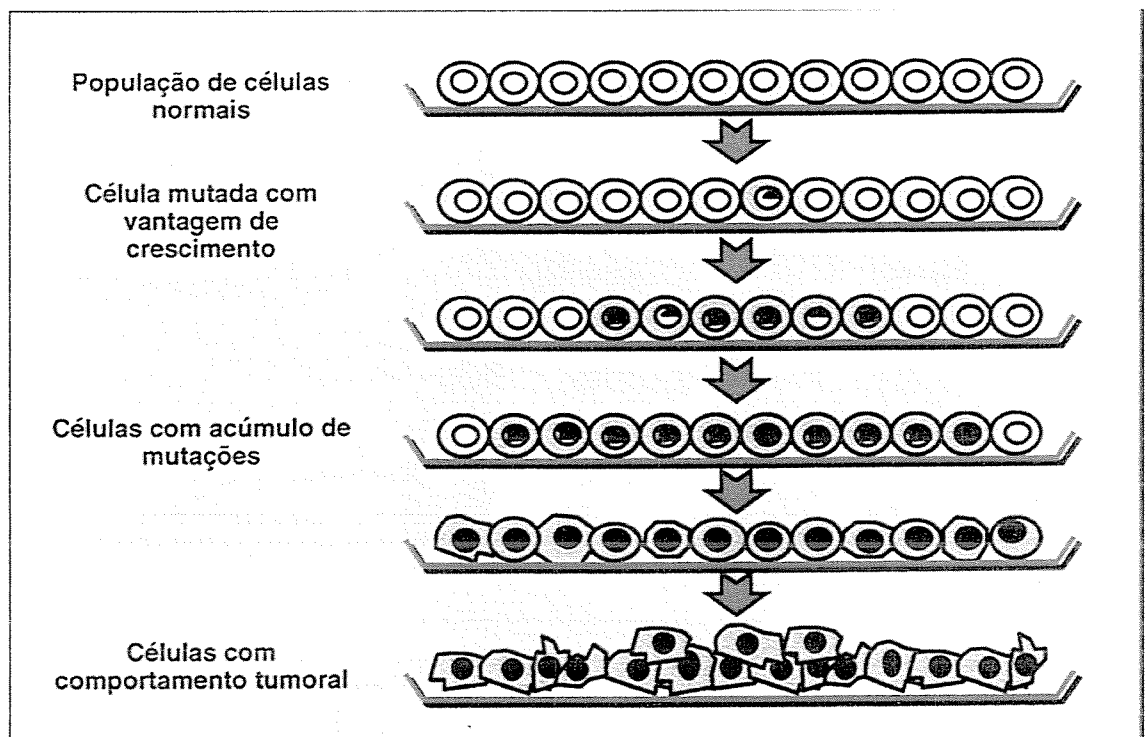


Figura 1 – Teoria da evolução clonal das células tumorais

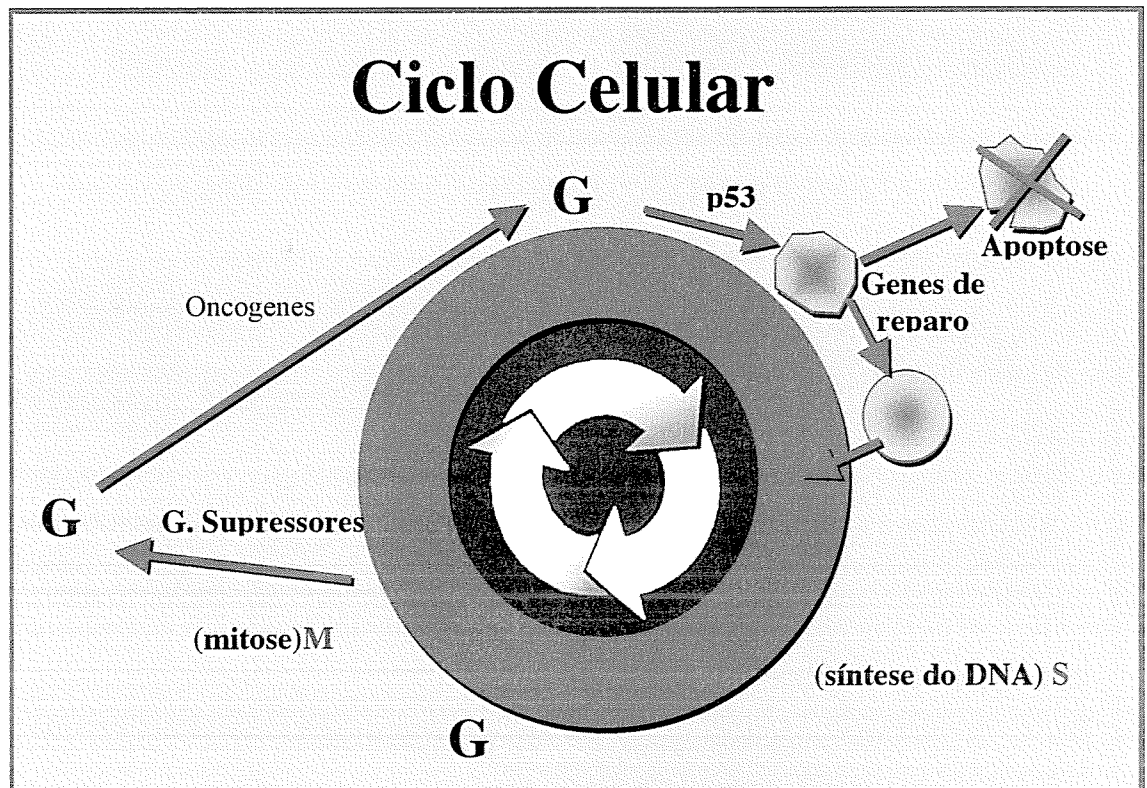


Figura 2 – Representação esquemática da interação entre oncogenes, genes de reparo, genes supressores de tumor, genes envolvidos na apoptose e no “checkpoint” do ciclo celular.

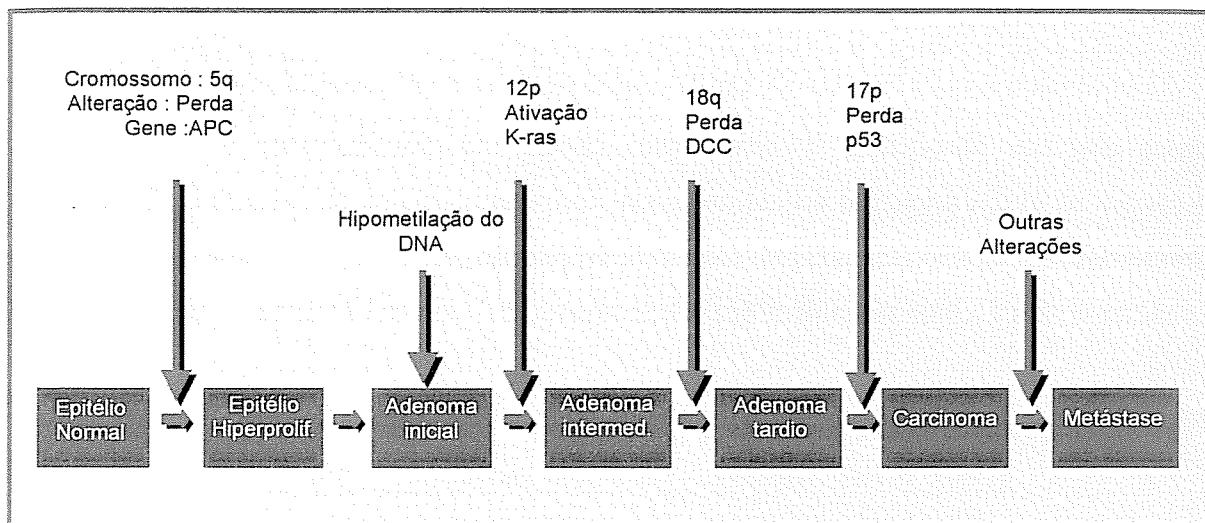


Figura 3 – Modelo proposto por Fearon e Vogelstein (1990) para a tumorigênese colorretal.

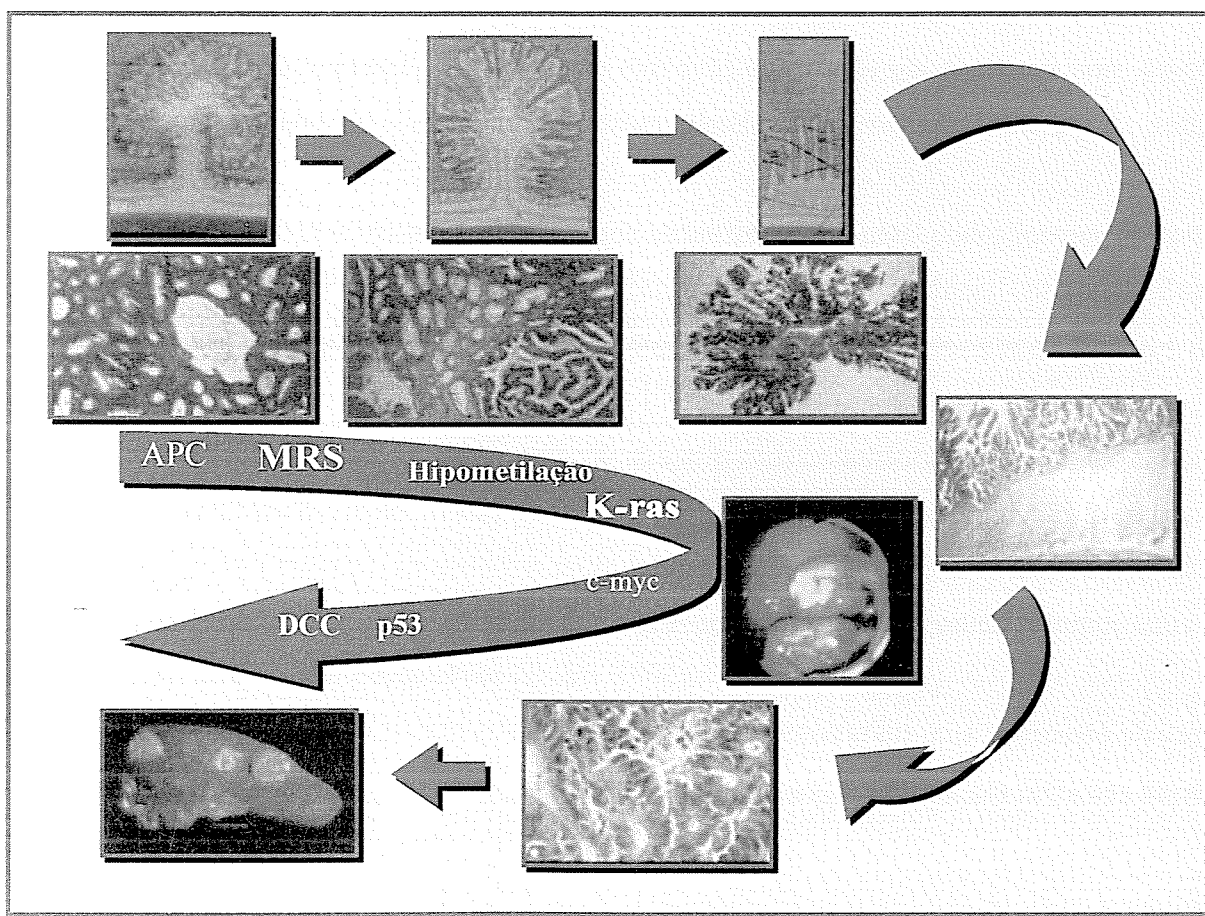


Figura 4 – Representação das alterações histopatológicas no desenvolvimento dos tumores colorretais.

1.4.1 Amplificação do c-myc em Tumores Colorretais

O proto-oncogene c-myc é um homólogo celular de v-myc, o gene transformador do retrovírus MC29 que tem sido encontrado como estando amplificado em uma grande variedade de linhagens de células cancerosas, por exemplo na linhagem HL60 de cultura de células de leucemia promielocítica, carcinoma pulmonar de pequenas células, neuroblastoma, câncer de cólon e câncer de mama (Vennstrom et al., 1982; Bonolla et al., 1988; Berns et al., 1992).

Até o momento a evidência dos dados não suporta um papel maior para amplificação ou rearranjo de oncogenes na gênese das neoplasias colorretais (Bufill, 1990).

Os oncogenes *ras* e c-myc constituem as principais categorias de genes transformadores reconhecidos até o momento com distintos e provavelmente interrelacionados efeitos no crescimento e divisão celular envolvidos nas vias de formação de tumores. Aumento na expressão destes genes têm sido observado em pacientes com câncer colorretal e provavelmente constituem alterações genéticas precoces (Alitalo et al., 1983; Bonolla et al., 1988).

Alguns investigadores têm proposto que expressão de c-myc pode, juntamente com outros aspectos, ajudar a definir grupos geneticamente distintos de câncer colorretal. Estes grupos parecem apresentar comportamentos biológicos distintos, sendo que os tumores de localização proximal, com conteúdo de DNA diplóide, cariótipo estável, regulação normal do c-myc e com deleções alélicas infreqüentes são considerados como formando o Grupo I, já os tumores de localização mais distal, com DNA hiperdiplóide, cariótipo instável, com desregulação mais freqüente do c-myc e com deleções alélicas freqüentes são considerados como formando o Grupo II. Os tumores incluídos no último grupo, estariam associados a maior agressividade e pior prognóstico (Bufill, 1990).

Esses autores, em 38 pacientes não selecionados, encontraram uma expressão elevada de c-myc em 85% das lesões do cólon esquerdo e uma expressão normal em 58% das lesões do cólon direito.

Esses dados são semelhantes à incidência relatada para os tumores de cólon esquerdo relacionadas com a síndrome da polipose e os do cólon direito relacionados com os pacientes portadores de HNPCC, respectivamente, sugerindo que c-myc possa estar envolvido no grupo II de tumor.

Uma produção aumentada de c-myc também foi mostrada em pólipos (62%) e tumores colorretais (75%) de pacientes com FAP. Desregulação de gene c-myc em câncer colorretal parece resultar de um defeito em um outro gene cujo produto regula a transcrição de c-myc, sendo que o gene APC tem sido implicado.

1.4.2 Perda Alélica e Genes Supressores de Tumor

Perdas de regiões específicas são observadas freqüentemente nas neoplasias colorretais. Geralmente a perda envolve somente uma das duas cópias parentais presentes na célula normal. Estas perdas alélicas são interpretadas como evidência de que as regiões afetadas contêm genes supressores de tumor.

Sabe-se que, a perda de grande parte do cromossomo 17p está presente em mais de 75% dos carcinomas colorretais, mas essa perda é infreqüente em adenomas de qualquer estágio. Em muitos pacientes a perda alélica de 17p parece estar associada com a progressão individualmente de adenoma para carcinoma (Lane, 1992; Vogelstein et al., 1990).

A região comumente perdida no cromossomo 17p nos tumores colorretais foi identificada e contém o p53, além disso mutações de p53 que resultam em substituição de aminoácidos, tem sido observadas no alelo remanescente de tumores colorretais que sofreram perda alélica. Logo uma mutação de ponto de um alelo de p53 acoplada com a perda do alelo selvagem remanescente parece ocorrer freqüentemente no tumor colorretal.

A segunda região mais comum de perda no câncer colorretal é no cromossomo 18q que é perdido em mais de 70% dos carcinomas e 50% dos adenomas avançados, nessa região foi identificado um gene candidato, supressor de tumor chamado DCC (Deleted in Colon Cancer), que codifica uma proteína com homologia a uma família de moléculas de adesão celular. O gene DCC é expresso na mucosa colônica normal, mas sua expressão está reduzida ou ausente na maioria dos carcinomas colorretais. Esse gene parece ter um papel no desenvolvimento dos tumores colorretais talvez através de alterações em interações célula – célula e célula – extracelular (Vogelstein et al., 1990).

Acredita-se, como já citado, que os genes supressores de tumor “agem recessivamente” ao nível celular, logo ambas as cópias, materna e paterna deveriam estar inativadas para que a função supressora de crescimento fosse eliminada (Knudson, 1985).

As síndromes com predisposição hereditária são resultantes da inativação na linhagem germinativa de uma cópia de um gene supressor, se essa premissa, juntamente com a da

recessividade são verdadeiras, os tumores que se desenvolvem teriam que inativar o alelo selvagem restante. Entretanto estudos de adenomas da FAP não revelaram perda alélica da região ligada à síndrome e que contém o gene APC (Adenomatous Polyposis Coli) o qual funciona como um gene supressor de tumor. Acredita-se que em alguns casos, um único alelo mutado pode conferir uma vantagem proliferativa por alterar o processo de oligomerização, daí a explicação para que o APC não tenha perda alélica nos adenomas da FAP, mas provavelmente há uma mutação em um dos alelos e posteriormente a perda do alelo selvagem permite a manifestação fenotípica completa da síndrome e aparecimento dos tumores, da mesma forma parece ocorrer com o p53. Essa hipótese é suportada por estudos que mostram que carcinomas colorretais com perda alélica de p53 são mais agressivos do que aqueles sem perda (Knudson, 1985; Vogelstein et al., 1990).

1.4.2.1 Estudo do p53 por Imuno-histoquímica no Câncer Colorretal

Nas duas últimas décadas ficou claro que a inativação da atividade supressora de tumor de p53 é um passo universal no desenvolvimento de cânceres humanos. Estudos têm demonstrado que a função de p53 requer integridade de uma seqüência específica de ligação ao DNA e que a proteína p53 liga-se a uma fita dupla de DNA, além disso proteínas mutantes de p53 podem agir com um efeito dominante negativo para inibir a atividade do alelo selvagem. Classicamente essa função de dominância negativa é alcançada pela formação de heterodímeros entre o mutante e a forma selvagem de p53 que se liga ao DNA como um tetrâmero. A função de oligomerização fica na região carboxiterminal de p53 fora da área onde a maioria das mutações ocorrem, logo mesmo uma proteína alterada é capaz de formar tetrâmeros, mas a interação entre proteínas selvagens e mutantes, podem deixar o complexo tetramérico incapaz de exercer seu papel (Lane, 1992; Vogelstein et al., 1992).

Kastan (1991) e colaboradores mostraram que o acúmulo do produto de p53 leva à parada do ciclo celular em G1, o que está de acordo com o já conhecido efeito inibidor de altos níveis do tipo selvagem de p53 – é como se tudo parasse no lugar.

O p53 normal age como uma “polícia molecular” monitorizando a integridade do genoma. Se o DNA é danificado, o p53 se acumula para a replicação, fornecendo um tempo extra para o reparo. Se o reparo falha, o p53 induz a célula à apoptose. Células tumorais em que o p53 está inativado por mutação, ou ligado à proteínas do hospedeiro, ou virais não podem levar a esse reparo. Essas células são geneticamente menos estáveis e acumulam

mutações e rearranjos cromossômicos em uma taxa aumentada levando à rápida seleção de clones malignos. Logo podemos dizer que, o p53 funciona bioquimicamente como um fator de transcrição específico e, biologicamente como um ponto de controle (*checkpoint*) em G1 para danos no DNA (Fig.5) (Lane, 1992; Vogelstein e Kinsler, 1992).

A proteína p53 normalmente é rapidamente metabolizada e degradada. Existe nas células em níveis muito baixos, mas sua forma mutada, funcionalmente inativada, freqüentemente acumula-se em células tumorais e torna-se detectável por imunohistoquímica. A imunoreação para p53 pode ser avaliada de acordo com Baas e cols (1994), e dividida em três categorias: tumores mostrando um alto índice (LI – Labeling Index) de imunorreatividade, são aqueles com LI > 30%; os de baixo índice com LI entre 1% e 30%; e os não reativos com LI <1% (Foster et al., 1998; Vogelstein e Kinsler, 1992; Baas et al., 1994).

Parece haver uma relação inversa entre a positividade da imuno-histoquímica de p53 e a instabilidade de microssatélite. Foster e cols (1998) observou que todos os tumores MIN (+) foram p53 (-) e os MIN (-) mostraram imuno-histoquímica (+) em 46%. Como mutações em p53 têm sido relatadas como sendo eventos tardios no modelo em múltiplos passos da carcinogênese, esses dados, segundo estes autores sugerem que MIN pode ser um evento que ocorre antes no desenvolvimento tumoral que as mutações de p53.

Nesses estudos houve uma forte associação entre MIN, conteúdo de DNA e expressão de p53, e embora essa associação, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra, não tenha sido estatisticamente significativa, pôde indicar uma relação entre esses aspectos.

Além disso, concluíram que adenocarcinomas bem diferenciados do cólon proximal, com poucos linfonodos acometidos, e sem metástases à distância na apresentação, além de imuno-histoquímica negativa para p53 são altamente sugestivos de MIN(+). Esses tumores devem ser discriminados de outros pouco diferenciados por eles parecerem estar associados com um melhor prognóstico comparados com tumores sem instabilidade de microssatélite (MIN-) (Lothe et al., 1993; Muta et al., 1996).

1.4.3 Instabilidade de Microssatélites e Genes de Reparo

A análise de tumores de membros de famílias com câncer colorretal não poliposo, demonstrou uma forma de instabilidade genética, em que seqüências de microssatélites, acumulam um tipo característico de mutação na qual um ou mais nucleotídeos eram acrescentados ou subtraídos, indicando um novo mecanismo genético envolvido na tumorigênese. Peinado e cols (1992) relataram um subgrupo de câncer colorretal que apresentavam deleção de nucleotídeos dentro da seqüência poli "A" das repetições Alu.

Posteriormente a instabilidade do DNA foi constatada por outros grupos em virtude de mudanças no número de elementos repetitivos nas seqüências de microssatélites em alguns cânceres colônicos (Aaltonen et al., 1993; Ionov et al., 1993; Thibodeau et al., 1993).

Esse fenótipo foi reconhecido a seguir em cerca de 15 a 30% dos cânceres colorretais esporádicos, assim como, em uma ampla variedade de tumores em outros locais, sugerindo que esse mecanismo genético estava associado amplamente ao câncer.

As regiões de microssatélites do DNA são constituídas por repetições em série de uma a seis bases. As repetições $(A)_n$ e $(CA)_n$ são muito comuns, estas últimas com cerca de 50.000 a 100.000 repetições, espalhadas por todo o genoma humano e são altamente polimórficas (Thibodeau et al., 1993; Dib et al., 1996; Weissenbach et al., 1992).

Determinadas seqüências de microssatélites de um mesmo indivíduo são fixas e são as mesmas em todos os tecidos. As seqüências são herdadas de maneira estável e por essa razão são extremamente valiosas para análise das ligações e mapeamento genético.

Quando os geneticistas microbianos reconheceram o padrão da instabilidade genômica observada em certos cânceres colorretais isso levou a estudos das atividades de reparo de DNA nas células humanas a na demonstração de que o sistema de reparo desigual (MRS – Mismatch Repair System) de DNA é altamente conservado entre procariotas e eucariotas (Marra e Boland, 1995).

O sistema de MRS é mais bem descrito na *E. coli*. Três genes são fundamentais para a correção dos erros de replicação do pareamento que são o mutS, mutL e o mutH.

Diversas enzimas como helicase II, DNA polimerase III, DNA ligase, proteína ligadora de DNA de filamento único, exonucleases são envolvidas no processo.

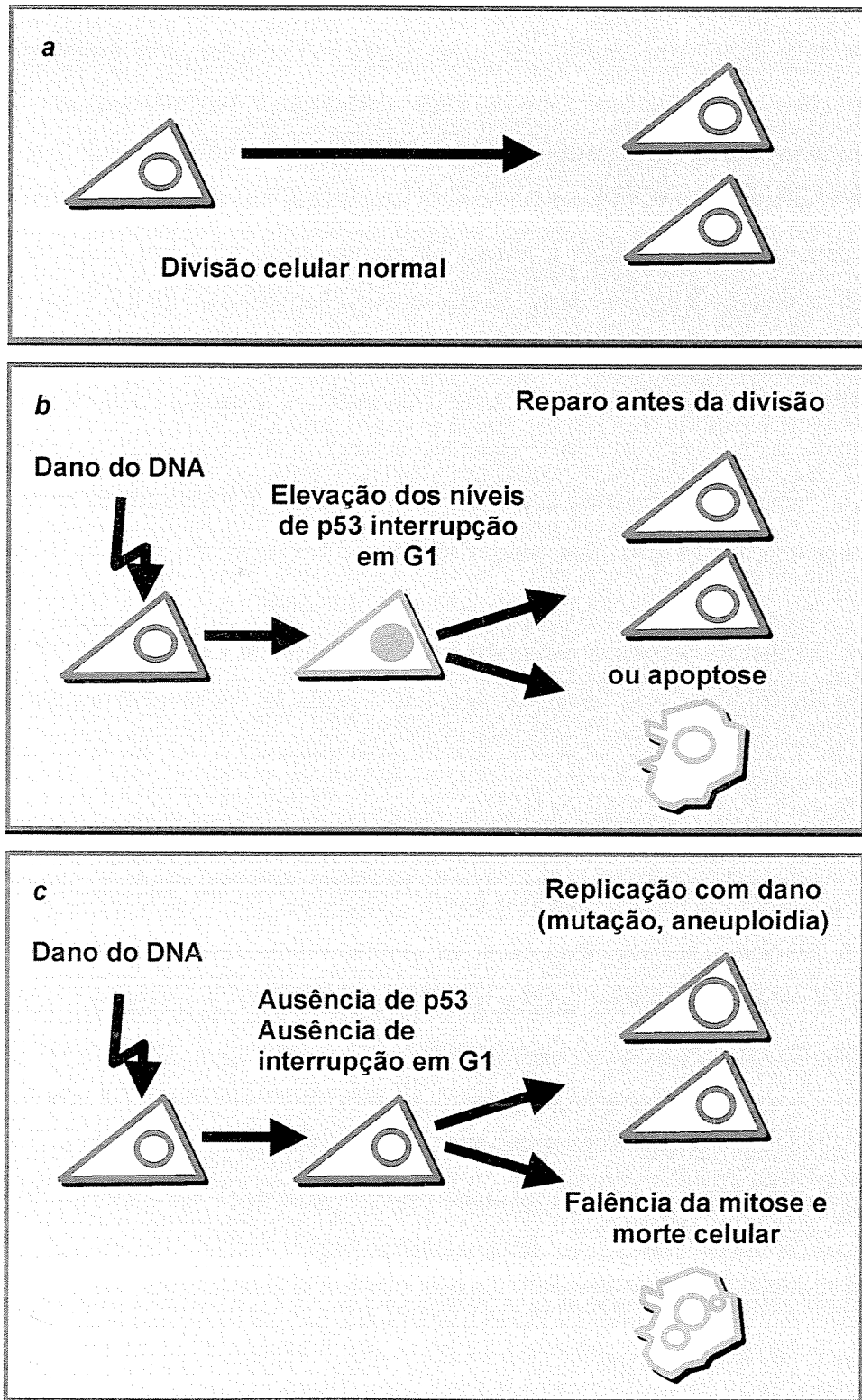


Figura 5 – Representação esquemática do possível mecanismo de ação do p53, conforme modelo apresentado por Lane (1992).

Inicialmente o mecanismo de correção do dano envolve uma ligação da proteína mutS a uma distorção do DNA seguida por uma fixação dependente de ATP de mutL ao complexo DNA-mutS. Esse complexo é necessário para ativar a endonuclease mutH que corta o filamento de DNA recém sintetizado nos locais GATC metilados, pois após a replicação de DNA, o filamento filho recém sintetizado é desmetilado transitoriamente e o MRS repara seletivamente esse filamento utilizando como molde o filamento original metilado, o que permite a discriminação do filamento no processo de reparo para manter a fidelidade da replicação. Esse sistema de reparo pode atuar na direção 3' ou 5', iniciando-se o processo de reparo na região mais próxima ao dano (Lahue et al., 1989; Cooper et al., 1993; Marra e Boland, 1996).

Freqüentemente o DNA celular sofre danos que podem ser secundários a diferentes mecanismos e existem nas células sistemas de reparo para consertar esses danos. O MSR consegue reparar erros que resultam da ação de agentes endógenos ou induzido por mutágenos, da mesma forma que repara os erros observados durante o processo de replicação do DNA, embora durante a replicação a maioria dos erros seja corrigida diretamente pela exonuclease 3'-5 da polimerase do DNA, muitas mutações que escapam a essa atividades são reparadas pelo MRS e incluem não apenas os erros de pareamento de bases mas também as alças de bases desemparelhadas que podem ocorrer no filamento de DNA recém sintetizado, pela derrapagem na replicação ("strand slippage").

Estudos desse sistema deram origem ao isolamento por Peltomaki et al. (1993) do primeiro homólogo humano hMSH2, localizado no cromossomo 2p e relacionado as famílias HNPCC (Drumond et al., 1995) e posteriormente do hMLH1 no cromossomo 3p (Papadopoulos et al., 1994) que é um análogo do gene bacteriano mutL.

Um gene humano homólogo de gene MSH6 de *S. cerevisiae* denominado proteína fixadora GT (GTBP) foi identificado como mutado em linhagens de células de câncer colônico deficiente em MRS (Fig.6) (Aaltonen et al., 1993; Palombo et al., 1995; Papadopoulos et al., 1995).

Esses dados levaram a caracterização de um novo fenótipo hipermutável denominado instabilidade de microssatélites (MIN – Microsatellite Instability) ou o fenótipo de erro de replicação (RER – Replication Error Repeats), associado mais freqüentemente a tumores HNPCC (1) e tumores de cólon direito.

Esse fenótipo está associado a 86% dos HNPCC e 15% dos esporádicos sendo que 57% dos adenomas HNPCC são RER + e 3% dos esporádicos indicando que a inativação de sistema ocorre precocemente na carcinogênese colorretal (Aaltonen et al., 1994; Moslein et al., 1996; Fuzikawa, 1996).

Esse fenótipo pode ser verificado, na prática, pela ocorrência de variação nas seqüências repetitivas no DNA genômico ou em regiões específicas. Essa variação nas seqüências repetitivas durante a replicação podem ocorrer basicamente por dois mecanismos que são o "crossing over" desigual e o deslizamento de fitas durante o processo de replicação ("strand slippage"). No primeiro mecanismo regiões homólogas contendo seqüências repetitivas se pareiam incorretamente, levando ao surgimento de uma fita com aumento e outra com redução do tamanho. No outro mecanismo fitas contendo regiões repetitivas se desalinham durante o processo de replicação de DNA e se reanelam de tal forma que uma ou mais repetições formem uma alça não pareada. Se a alça ocorrer na fita molde a fita filha apresentará uma deleção e se a alça for na fita nascente, após a síntese haverá um aumento na sua seqüência (Strand et al., 1993) (Fig.7).

Quando há uma mutação em um dos genes de MRS esses erros não são corrigidos e as células filhas herdaram essas alterações nas regiões repetitivas. Uma massa tumoral contém várias células com diferentes variações dessas repetições que podem ser detectadas pela técnica de PCR, assim o padrão de bandas obtido das células tumorais quando comparado com o das células normais vai mostrar a presença de bandas extras e que correspondem aos novos alelos que surgiram por erros de pareamento do DNA que não foram corrigidos por um MRS defeituoso (Peltomaki et al., 1993; Peinado et al., 1992).

O reparo dos erros cometidos durante a replicação do DNA não é o único papel desempenhado pelo MRS ao editar o DNA. As proteínas de MRS são componentes cruciais na regulação dos eventos da recombinação, funcionando como uma barreira para as permutas ilegítimas entre as seqüências de DNA quase homólogas, sendo assim as células deficientes em MRS não possuem apenas um fenótipo mutador com instabilidade dos microssatélites, mas também um fenótipo de hiperrecombinação com instabilidade cromossômica (de Wind et al., 1995; Datta et al., 1996).

A instabilidade de microssatélites é portanto a expressão fenotípica de um MRS defeituoso, permitindo o acúmulo de mutações, não só em regiões de microssatélites, mas

também, em qualquer outro gene, inclusive genes envolvidos na regulação do ciclo celular, sejam oncogenes ou genes supressores de tumor.

O HNPCC parece acompanhar em grande parte o modelo de genes supressores de tumor de Knudson onde uma mutação heterozigota em um dos genes MRS na linhagem germinativa gera uma predisposição para o câncer nos indivíduos de famílias com HNPCC. O surgimento do tumor requer a inativação do alelo tipo selvagem por mutação somática ou sua perda (Knudson, 1985; Foster et al., 1998).

Aproximadamente 12% a 35% de carcinomas colorretais esporádicos possuem o fenótipo mutador e ele ocorre mais frequentemente em tumores proximais à flexura esplênica do cólon do que em tumores do lado esquerdo do colon (Thibodeau et al., 1993; Kim et al., 1994; Maniamparpil et al., 1999).

Dos tumores colônicos esporádicos MIN positivos, 82% a 94% são descritos como localizados no cólon proximal. Existem fortes evidências de que pacientes MIN + com carcinoma colorretal esporádicos têm um melhor prognóstico do que aqueles MIN - A hipótese de que MIN caracteriza um conjunto particular de câncer colorretal esporádico foi mais evidenciado por estudos que demonstraram uma correlação da positividade de MIN com características moleculares, morfológicas e imuno-histoquímicas bem definidas.

Tumores esporádicos com MIN + são associados com produção extracelular de mucina, pobre diferenciação e DNA diplóide, eles também mostram uma correlação negativa com mutação ou acumulação imuno-histoquímica de p53 (Buffy, 1990).

1.4.4 Outras Alterações Somáticas - Ploidia do DNA

Uma perda significativa de grupos metil no DNA tem sido relatada como ocorrendo muito precocemente na tumorigênese colorretal, exames de DNA de adenomas tem demonstrado que o estado da ploidia do DNA foi uma variável prognóstica independente por análise multivariada incluindo parâmetros prognósticos tradicionais. Alguns autores observaram um aumento na sobrevida de pacientes com tumores diplóides em estágio 2 e 3 quando comparados com pacientes com tumores aneuplóides, embora essas diferenças não tenham atingido uma significância estatística. Em particular pacientes com estágio 2 com tumores diplóides tinham um excelente resultado com sobrevida global de 5 anos de 97%. Já a sobrevida global de pacientes no estágio 3 com tumor com DNA diplóide foi semelhante a

sobrevida de 5 anos de pacientes no estágio 2 com tumor aneuplóide (81% e 78% respectivamente) e no estágio 3 com DNA aneuplóide foi de 60% (Lanza et al., 1998).

A ploidia de DNA pode ser analisado pelo método de citometria de fluxo (FACScan flow cytometer) onde todos os espécimens são colhidos na sala de cirurgia e rapidamente processados, são colhidas amostras de tumor e do tecido normal, deve haver uma quantidade de célula tumoral maior que no mínimo 60% no material a ser analisado, o que deve ser confirmado pela coloração por hematoxilina – eosina e análise microscópica de um fragmento de tecido.

De acordo com uma convenção internacional, pela citometria de fluxo, adenocarcinoma com um pico único de G0/G1 são classificados como DNA diplóide, somente tumores com no mínimo dois picos separados G0/G1 são considerados aneuplóides. O grau de DNA aneuplóide é expresso pelo índice de DNA (DI) definido como a relação da média do pico da população aneuplóide dividido pelo da população diplóide. Sendo que tumores com um índice de DNA ($DI > \text{ou} = 1,10$) são diplóides, aqueles com índice maior que 2 são tetraplóides e exibem um prognóstico e comportamento biológico bastante semelhantes, já os com DI maior que 1,10 e menor que 2 são os aneuplóides com pior prognóstico. Por definição célula diplóide tem DI de 1,0.

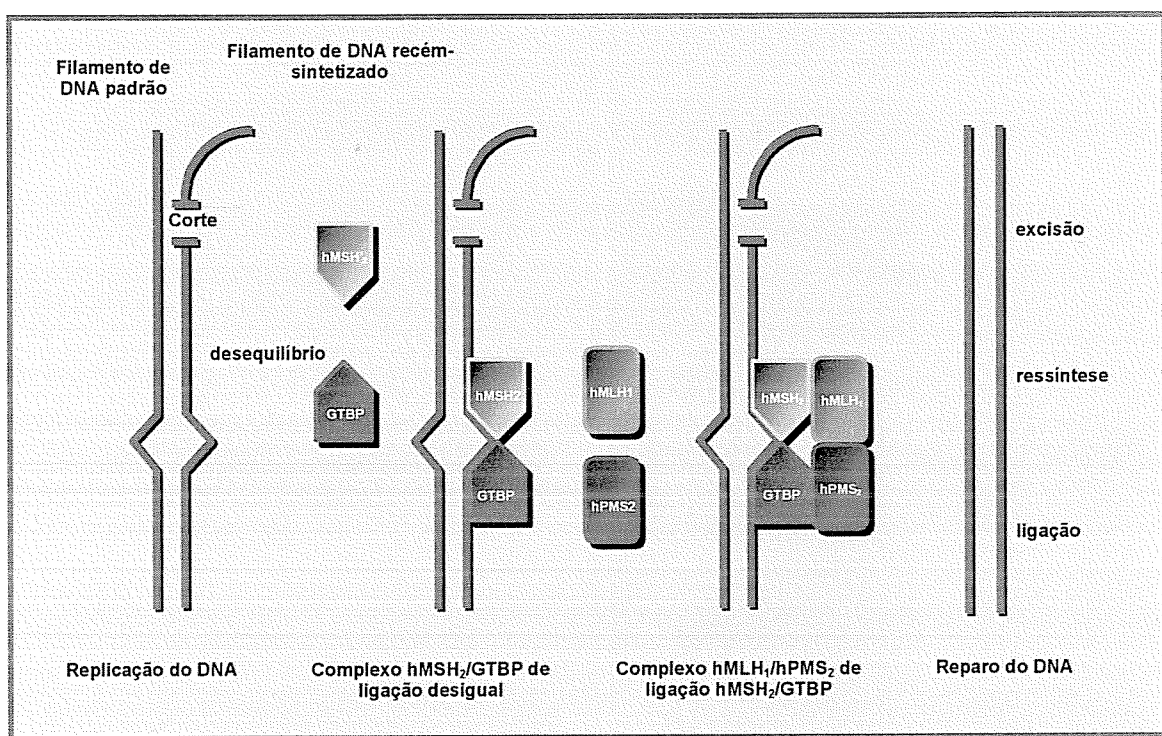


Figura 6 – Representação esquemática de modelo para reconhecimento de erros de pareamento do DNA e seu reparo.

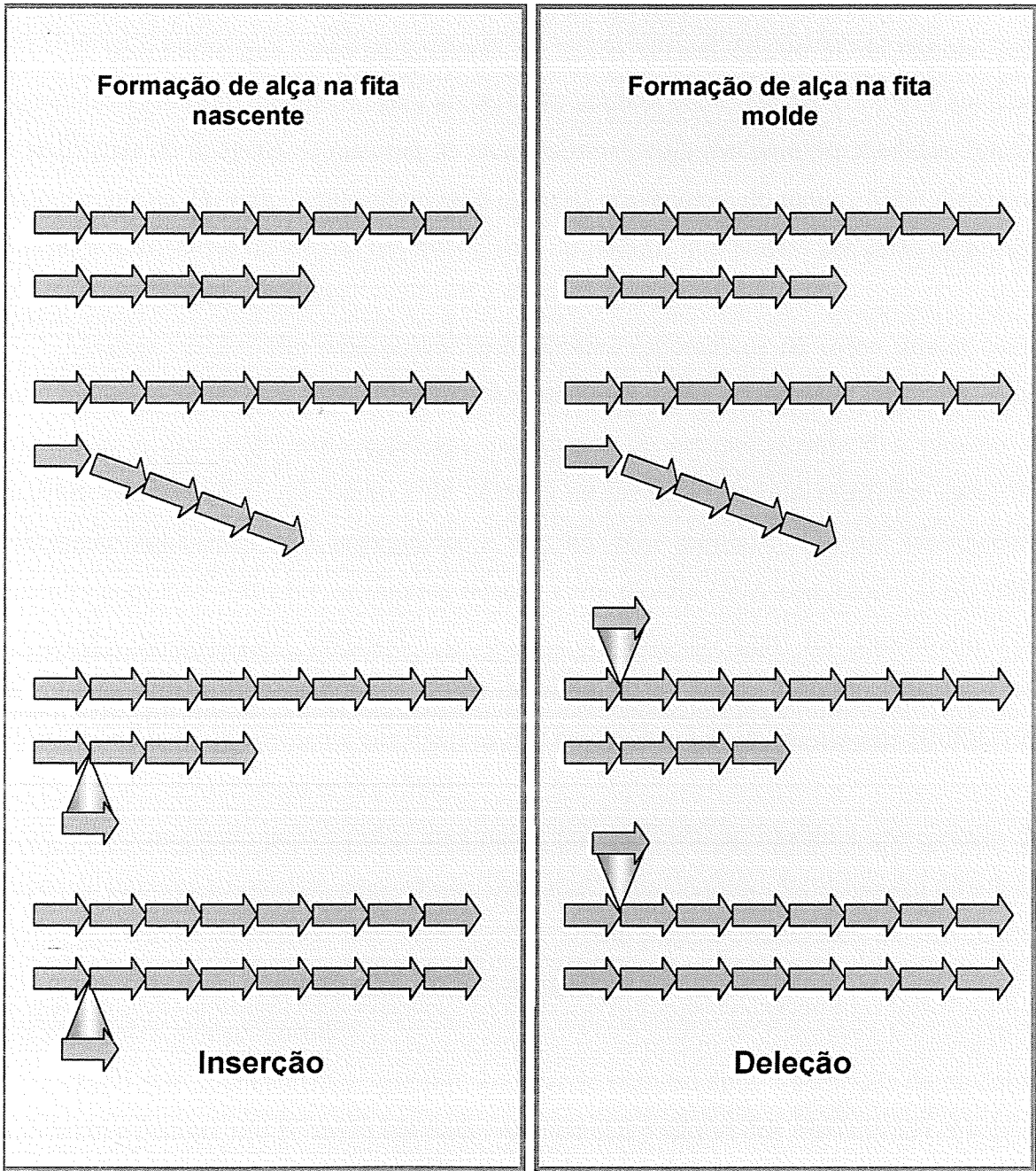


Figura 7 – Modelo de derrapagem, “strand slippage” durante a replicação do DNA.

Outra forma de avaliar a ploidia é pela morfometria digital computadorizada, que avalia de forma indireta o conteúdo de DNA no núcleo da célula. Esse método baseia-se na relação entre forma e tamanho do núcleo assim como na intensidade da coloração de DNA (Castro, 1995; Auer et al., 1980).

É importante que tanto as amostras de tecido normal quanto as de tumoral sejam submetidas ao mesmo tratamento para preparo das lâminas que então são coradas e analisadas no analisador de imagens. O material do tecido normal, cuja mediana das medidas, funciona como o controle $2n$, será comparado com o material proveniente do tumor. Além disso pode-se fazer a análise dos dados em um histograma de pontos, que poderá ser então relacionado com a ploidia de forma indireta.

Alguns estudos têm evidenciado que tumores esporádicos de cólon direito contém mais freqüentemente um DNA diplóide e que esses estão associados com um melhor prognóstico e que estão mais próximos em termos de comportamento dos tumores dos pacientes com HNPCC, já tumores de cólon à esquerda do ângulo esplênico estão mais comumente associados com aneuplóides e tem um pior prognóstico, mais semelhantes a pacientes com FAP. Não foi encontrada relação entre ploidia DNA com idade, sexo, estágio do tumor, envolvimento linfonodal e mucosa extramural, mas foi encontrado como relacionado com o sítio anatômico e tipo histológico do tumor. Células aneuplóides são detectadas mais freqüentemente nos tumores não mucinosos que nos mucinosos (Bufill, 1990; Tomoda et al., 1993; Suzuki et al., 1998).

Até o momento parece haver uma maior concordância da literatura que existem dois grupos de tumores colorretais esporádicos. Um constituído daqueles localizados à direita com característica mucossecretora, com $MIN +$, $p53 -$ e com melhor prognóstico e outro daqueles localizados em cólon esquerdo com DNA aneuplóide e sem instabilidade de microssatélites, com $p53 +$ com pior prognóstico.

Todo esse conhecimento, que teve um grande impulso após a descrição do modelo de Vogelstein e Fearon, nos permitiu um maior entendimento não só dos mecanismos envolvidos na tumorigênese, mas também daqueles envolvidos no controle normal do funcionamento celular. Dentro dessa nova realidade procura-se cada vez mais caracterizar, estratificar ou identificar subgrupos de tumores dentro do universo das diversas neoplasias malignas de um determinado órgão que nos permitam realizar um diagnóstico mais precoce ou mesmo poder oferecer aos portadores dessas doenças um tratamento mais específico relacionado

diretamente ao comportamento de sua neoplasia com comportamentos biológicos próprios e respostas diferentes a diversos tratamentos, a agentes quimioterápicos, bem como à busca incessante de tentar responder às perguntas que dizem respeito a diferenças na evolução de tumores malignos que sob a ótica grosseira da realidade anterior nos pareciam todos iguais (Giardello, 1997; Aebi et al., 1996).

É crescente na literatura o número de trabalhos que visam associar os aspectos clínicos, morfológicos e da evolução das neoplasias, estes muitas vezes mais acessíveis, com alterações da ploidia do DNA, descoberta de novos genes envolvidos no processo, presença ou não de alterações em genes já conhecidos ou nos seus produtos, ausência de ação de outros genes supressores de tumor APC, p53, DCC, p21 e mutações em genes de reparo através da instabilidade de microssatélites. A identificação de mutações genéticas, de alterações moleculares e morfológicas e suas interrelações associadas com neoplasias podem ser úteis para os clínicos, para realizar triagem de pacientes assintomáticos e possíveis cirurgias profiláticas; definir indicação de quimioterapia; sugerir o prognóstico; aplicar terapia gênica quando essa for disponível. Dentro desse contexto é que nos propusemos a estudar algumas das alterações envolvidas na tumorigênese colorretal em pacientes provenientes de hospitais de Belo Horizonte.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Estudar a frequência de algumas alterações gênicas e moleculares em carcinomas colorretais obtidos de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico em hospitais de Belo Horizonte, e avaliar a associação entre essas alterações com parâmetros histológicos e da progressão da tumorigênese.

2.2 Objetivos Específicos

- 2.2.1 Estabelecer contato com hospitais de Belo Horizonte para a obtenção de material para o estudo.
- 2.2.2 Desenvolver um protocolo para a coleta de material, que permita a obtenção de espécimens adequados para análise dos aspectos propostos.
- 2.2.3 Avaliar a ploidia do DNA nuclear nas células do tecido tumoral em relação ao tecido normal, através de Morfometria Digital Computadorizada.
- 2.2.4 Procurar a ocorrência de amplificação do oncogene c-myc no material tumoral.
- 2.2.5 Pesquisar no material tumoral o acúmulo da proteína p53 por técnica de imuno-histoquímica.
- 2.2.6 Avaliar ocorrência de instabilidade do loco polimórfico D17S855, a partir do DNA genômico extraído do material tumoral e normal de cada paciente.
- 2.2.7 Comparar a relação entre os resultados obtidos para a ploidia, amplificação do c-myc, imuno-histoquímica para p53, instabilidade do microssatélite D17S855 entre si e com parâmetros clínicos e da biologia tumoral tais como idade, sexo, localização do tumor, níveis de CEA pré operatório, estadiamento e grau histológico do tumor.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução desse projeto, inicialmente era necessário a padronização de técnica que permitisse a obtenção de material adequado, no qual se pudesse realizar a comparação de alterações gênicas e da ploidia do DNA entre células do tecido tumoral e normal. Mais especificamente que permitisse avaliar as diferenças entre os dois tecidos em relação à ploidia, instabilidade do microssatélite D17S855, imuno-histoquímica para p53, amplificação do c-myc, suas interrelações, bem como com dados da histologia. Para isso era importante que obtivéssemos amostras pareadas de cada paciente, uma com o material tumoral a ser pesquisado e outra com material normal que funcionaria como controle. Assim sendo a amostra de tecido neoplásico foi colhida na intimidade do tumor e o material normal na mucosa colônica em área distante do tumor.

A mucosa colônica representa o padrão normal ideal uma vez que é de onde se originam os tumores colorretais, portanto material ideal para se comparar com a célula tumoral para avaliação da ploidia além disso possui alta celularidade, é facilmente acessível e também se presta como controle para as outras avaliações a serem pesquisadas.

As amostras foram obtidas de pacientes submetidos a tratamento cirúrgico de tumores de colo e reto no período de Novembro de 1998 a Dezembro de 1999, oriundos do Serviço de Coloproctologia do Hospital Felício Rocho e do Serviço de Coloproctologia e da Clínica Cirúrgica do Hospital Governador Israel Pinheiro.

O projeto de pesquisa foi submetido a aprovação pelas Comissões de Ética Científica, desses estabelecimentos, conforme normas vigentes do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa.

3.1 Pacientes

Foram incluídos na pesquisa pacientes portadores de adenocarcinoma colônico, esporádico ou familiar, submetidos a tratamento cirúrgico, sem relato de tratamento prévio. Pacientes com história de radioterapia ou quimioterapia, foram excluídos do protocolo, bem como pacientes com tumores recidivantes.

No período referido recolheram-se espécimes de 41 pacientes. Não houve nenhum critério de seleção dos pacientes, quanto a sexo, raça, idade, localização do tumor. Foram

considerados pacientes submetidos a cirurgia de urgência, como os casos de obstrução e pacientes, submetidos a cirurgia eletiva. Em 10 dos 41 casos o material não pode ser aproveitado, ou porque as amostras chegaram para o laboratório após muito tempo de terem sido colhidas, ou porque não estavam adequadamente identificadas ou ainda porque foram usadas para se padronizar os métodos adequados de coleta e preparo do material, em um caso aconteceu de ser enviado apenas tecido normal. Logo foram processados 31 casos, listados na tabela 2. Entre esses houve um caso em que foi possível extrair o DNA, mas as lâminas para avaliação da ploidia foram danificadas durante a coloração pelo Feulgen e como as amostras eram muito pequenas não foi possível recuperá-las, além disso ao ser feita análise microscópica a quantidade de células tumorais na amostra era em torno de 5% e o material foi desprezado (caso 4). Em um outro caso a quantidade de tecido tumoral na amostra foi de 10% e o mesmo também foi desprezado (caso 31).

Finalmente amostras de 29 pacientes prestaram-se para análise, sendo que, em 22 casos foi possível a preparação de lâminas adequadas para leitura e estimativa do conteúdo de DNA e avaliação da ploidia, nas outras 10 amostras não foi possível a avaliação da ploidia devido à destruição celular no material e/ou baixo número de células por lâmina ou ainda coloração inadequada pelo Feulgen, mas foi possível analisarem-se os outros aspectos considerados. Desses pacientes 19 eram do sexo feminino e 10 do sexo masculino. A idade variou de 24 a 81 anos com a mediana de idade 71,4 anos.

Todos os pacientes com história familiar tinham menos de 50 anos sendo que o paciente com suspeita de FCC tinha 45 anos e os que preenchiam os critérios de FAP, um tinha 29 e outro 32 anos, este último já com adenocarcinoma, entre os pacientes com tumores esporádicos apenas 3 tinham menos de 50 anos.

Tabela 2 – Apresentação dos dados clínicos e estadiamento dos pacientes.

No Caso	Sexo	Idade	Localização	Estádio	Grau de dif. hist.	CEA	% de cel. tumorais
0	M	45	colon D	III	mod.	↑	100%
1	F	73	colon D	III	Indif.	↑	90%
2	F	74	colon E	II	mod.	↑	80%
3*	F	32	colon E	II	Indif.	N	80%
4**	M	78	colon E	II	mod.	N	< 5%
5	M	78	colon E	II	mod.	N	100%
6	F	71	colon E	I	mod.	N	40 %
7	F	69	colon E	II	bem dif.	N	80%
8♦	F	65	colon E	I	bem dif.	↑	80%
9	M	57	colon E	III	mod.	↑	100%
10	F	56	colon E	III	mod.	↑	40%
11	F	53	colon E	IV	mod.	N	100%
12♦	F	74	colon E	II	mod.	↑	40%
14	M	81	colon E	III	mod.	N	80%
15	M	81	colon E	IV	mod.	↑	65%
16	F	62	colon E	III	mod.	↑	100%
17	F	74	colon E	II	bem dif.	N	80%
18*	F	70	colon D	II	mod.	↑	100%
19	M	58	colon D	III	mod.	↑	100%
20	M	72	colon E	II	mod.	N	80%
21♣	F	72	colon E	III	mod.	↑	100%
22*	F	59	colon E	II	mod.	N	80%
23	F	77	colon E	III	mod.	↑	90%
24	M	45	colon E	IV	mod.	↑	100%
25	F	65	colon E	II	mod.	N	40%
26	M	24	colon E	III	mod.	N	90%
27*	F	62	colon E	I	mod.	N	65%
28*	F	29	colon D	III	mod.	↑	100%
29*♣	F	81	colon E	III	indif.	↑	65%
30	M	29	Polipose	–	–	–	–
31**	M	72	colon E	II	indif.		< 10%

* Amostras sem análise de ploidia:
 mod – moderadamente diferenciado;
 indif – indiferenciado;
 bem dif – bem diferenciado.

** Amostras desprezadas – material com percentagem de tumor menor que 5% e 10%.

♣ Pacientes com relato de tumor metacrônico.

♦ Pacientes operados na urgência.

Em todos os casos, os pacientes eram portadores de adenocarcinoma, exceto um paciente que possuía uma forma atenuada de polipose colônica e no qual não havia tumor (caso 30) esse paciente, (III-3) juntamente com sua irmã (III-6) (caso 3), apresentava uma forma atenuada de polipose colônica com padrão de herança autossômica dominante conforme pode ser verificado no heredograma (Fig.8).

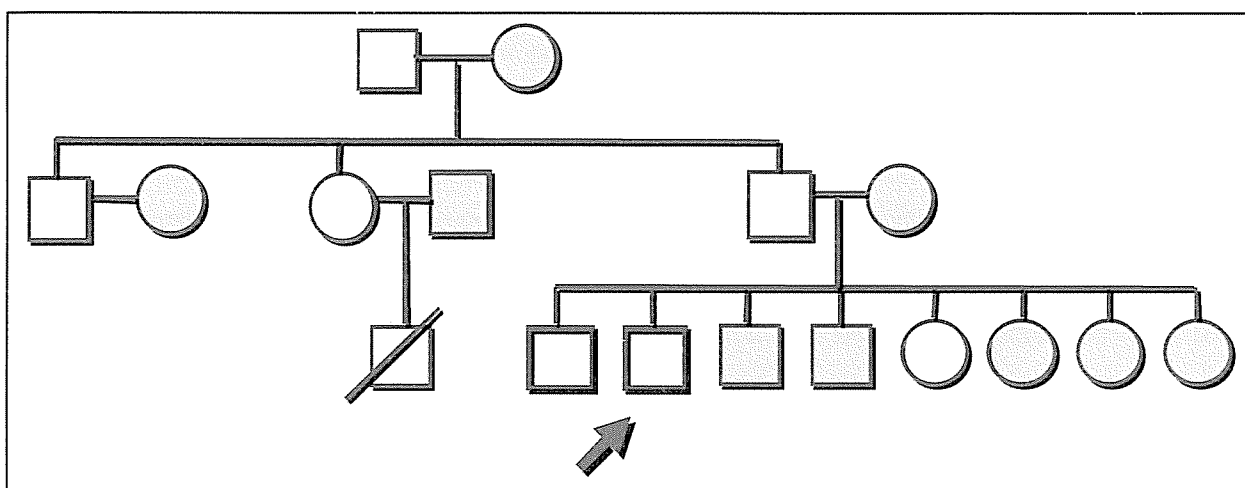


Figura 8 – Heredograma da família dos pacientes 3 (III-6) e 30 (III-3) com FAP.

Um paciente (Caso 0) apresentava história familiar mas sem preencher os critérios de Amsterdã. Não houve nenhum caso de tumor sincrônico e 2 pacientes apresentavam história de tumor metacrônico, sendo que em ambos o primeiro tumor era de cólon direito. No caso 29 o primeiro tumor foi há 27 anos e no caso 27 há 11 anos. Houve 5 casos de tumores de cólon direito sendo que 1 deles possuía história familiar, os outros 24 casos da amostragem eram de tumores do cólon esquerdo e entre esses 11 eram de reto. Quanto ao grau de diferenciação 3 eram bem diferenciados, 22 eram moderadamente diferenciados e 3 eram indiferenciados. O material tumoral foi considerado bem diferenciado quando 90% ou mais das células formavam glândulas; moderadamente diferenciado quando 30% a 90% das células formavam glândulas e se menos de 30% então o tumor era considerado indiferenciado (Kim et al., 1994).

Dessas 29 amostras 12 eram do estágio III, 10 do estágio II, 3 do I e 3 do IV e um dos pacientes não possuía tumor. O CEA estava elevado em 16 casos (Tab. 2).

O estadiamento dos tumores foi realizado pelos serviços de anatomia patológica dos respectivos hospitais. Apenas a avaliação das amostras a serem estudadas é que foram analisadas por um mesmo patologista, Dr. Paulo Guilherme O. Salles como forma colaborativa com a realização da pesquisa.

3.2 Coleta e Armazenamento das Amostras

Foram recolhidas amostras de 0,5 a 1,0 cm de diâmetro das peças cirúrgicas daqueles pacientes, tanto do tecido normal, quanto da intimidade do tecido neoplásico além de tecido de lesão pré-maligna (pólipo) quando houvesse.

Uma amostra dos fragmentos obtidos, após serem lavados em soro fisiológico 0,9% para retirada de resíduos fecais e parte do muco, abundante nesse tecido, foram colocadas imediatamente em frascos estéreis contendo etanol/glicerol (1:1).

Em seguida era realizada a microdissecção com lupa para retirada da maior quantidade possível de tecido de sustentação, bem como de vasos e outros tecidos, com o objetivo de que permanecesse a maior quantidade possível de tecido apenas da mucosa e o material era então armazenado a -20°C até o processamento para extração do DNA.

Outra pequena amostra dos fragmentos, logo após ser retirada da peça e lavada, foi colocada em meio com PBSA enriquecido com glicose a 2%, para manter a viabilidade das células e então processada tão logo quanto possível para a análise da ploidia, sendo que esse tempo não deveria ultrapassar 4 horas, pois após isso ocorria destruição de grande número de células.

Um fragmento representativo das amostras mantidas em etanol/glicerol era submetido a análise microscópica pela hematoxilina eosina (Prophet et al., 1994) após procedimentos de fixação e inclusão em parafina para se confirmar a presença do tumor bem como a porcentagem de células tumorais na amostra (item 3.3).

3.3 Preparo das Lâminas para Análise Microscópica

Fragments representativos das amostras a serem analisadas foram obtidos dos espécimes armazenados e foram submetidos a análise microscópica após processamento pelas técnicas rotineiras para inclusão em parafina (Prophet et al., 1994). As lâminas foram coradas pela hematoxilina-eosina e examinadas ao microscópio.

Em cada amostra do tecido tumoral, avaliava-se a presença do tumor, a existência de outros tecidos nas lâminas que não fosse a mucosa, bem como a porcentagem de células tumorais presentes nas amostras.

Aquelas onde a quantidade de células tumorais em relação às células normais fosse menor que 60% foram desprezadas (caso 4 e caso 31).

3.4 Preparo das Lâminas para Análise da Ploidia

O tecido coletado e estocado em PBSA enriquecido com glicose foi lavado em PBSA para retirada de resíduos presentes, bem como de muco que é abundante na mucosa colônica. Posteriormente realizou-se a dissecação para a retirada de tecido de sustentação e de vasos sanguíneos, conforme descrito anteriormente tanto para o tecido tumoral quanto do normal. Em seguida a mucosa normal ou o tecido tumoral foram cortados em pequenos fragmentos, que foram novamente lavados em PBSA por agitação em tubos de ensaio por 3 ou 4 vezes.

Então os fragmentos foram colocados em tubos de ensaio com 5 volumes de PBSA e colagenase para uma concentração final de 0,2%, durante 45min., a 38°C para que ocorresse digestão dos tecidos de adesão celular e desprendimento das células. A digestão foi monitorada em tempos regulares, submetendo-se pequenas amostras à microscopia para se avaliar o desprendimento das células e se as mesmas já não estavam sofrendo danos devido a ação da colagenase (Hood et al., 1990).

Posteriormente a colagenase era inativada com PBS ou com fixador etanol/ácido acético (3:1). Retiraram-se do meio os fragmentos maiores não digeridos e o sobrenadante era centrifugado, usando-se centrífuga de bancada Excelsa Fanem, por 1 a 2 minutos, a 500rpm para a retirada dos grandes fragmentos ainda restantes.

Repetia-se o procedimento por 3 a 4 vezes dessa vez com velocidade de centrifugação de 1.000rpm. Recolhia-se o sobrenadante e centrifugava-se por 10 a 15min. O "pellet" obtido dessa forma era ressuspenso e aplicado às lâminas. Essas eram fixadas novamente com etanol/ácido acético e coradas pelo método de Feulgen (Prophet et al., 1994). Foi realizada também em uma amostra de material coloração pelo Fast Green para se avaliar a integridade das células que estavam sendo analisadas, sendo que as mesmas apresentaram um bom padrão de preservação.

As lâminas foram analisadas em microscópio acoplado a um programa de computador para interpretação morfométrica baseado na intensidade da coloração e no tamanho do núcleo (Caliari, 1997).

É importante que os núcleos das células estejam bem preservados, as lâminas homogeneamente coradas e que as células estejam isoladas umas das outras para que possa ser feita a contagem baseada no método de morfometria digital com o programa KS 300. É necessário a contagem de células do tecido tumoral e do tecido normal para que os resultados possam ser comparados entre si em relação ao valor da ploidia. Após a obtenção dos valores

por esse método foi calculada a mediana do valores no tecido tumoral e no tecido normal e comparadas entre si.

A medida da ploidia das células do tumor no computador, e considerando-se o valor $2C$ como sendo a medida do conteúdo de DNA das células do tecido normal de cada paciente, permite classificar os tumores, segundo o valor da mediana das medidas de ploidia de suas células, como sendo (Auer et al., 1980; Castro, 1995).

Diplóides - se a mediana estiver entre $1,75$ e $2,5C$,

Hiperdiplóides - se a mediana estiver entre $2,6$ e $3,4C$,

Tetraplóides - se a mediana estiver entre $3,5$ e $5,0 C$,

Hipertetraplóides - se a mediana for maior que $5,1 C$,

Hipodiplóides - se a mediana for menor que $1,75C$,

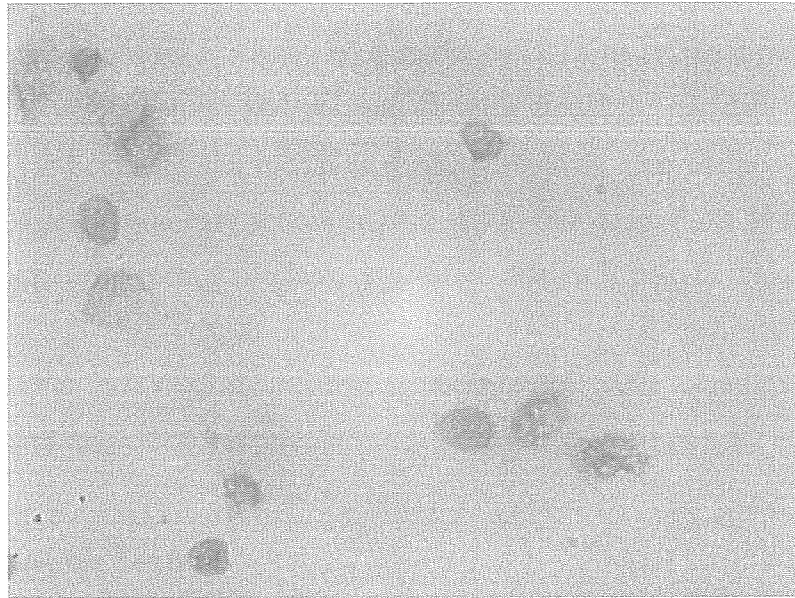
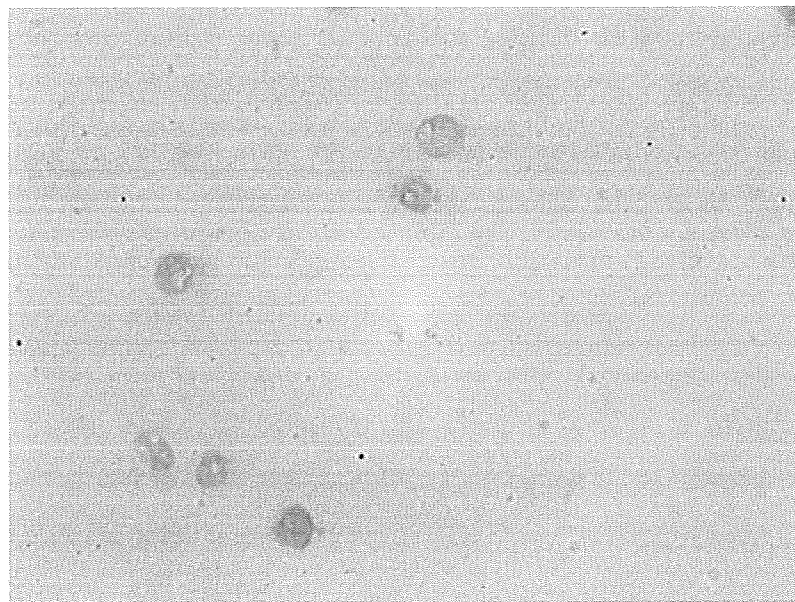
**A****B**

Figura 8A – Carcinoma colorretal. Avaliação da ploidia mostrando células bem coradas e isoladas. Controle – tecido normal. Lâminas coradas pelo Feulgen, 40X.

Figura 8B – Carcinoma colorretal. Avaliação da ploidia mostrando células bem coradas e isoladas. Tumor. Lâminas coradas pelo Feulgen, 40X.

Uma outra forma de classificação é pelo padrão de distribuição das medidas do conteúdo de DNA observado em um histograma de pontos. A classificação pode ser feita segundo os seguintes padrões:

- Tipo I caracterizado por ter um único pico modal de DNA na região diplóide ou próxima a diplóide, poucas células se desviando do valor modal.
- Tipo II mostra também um valor modal na região tetraplóide ou próximo a ela, além do pico ao redor de 2C, somente poucas células saindo fora dessa faixa de DNA.
- Tipo III usualmente apresenta dois picos, mas difere de tipo II pelo desvio dos valores de 2C e 4C.
- Tipo IV mostra uma pronunciada e irregular aneuploidia, com quantidades de DNA por célula variando de níveis próximos a 2C à valores próximos a 6C ou mesmo 8C.

3.4.1 Coloração pelo Feulgen

As lâminas preparadas conforme descrito acima a partir das amostras coletadas em PBSA enriquecido com glicose eram fixadas em solução de etanol/ácido acético 3:1 por 3min., em seguida era feita a hidrólise em HCl 5N durante 15min. à temperatura ambiente em recipiente fechado. As lâminas eram então passadas por três banhos de água destilada e deixadas secarem. No próximo passo eram colocadas no reativo de Schiff por 90min. à temperatura ambiente em frasco envolvido por papel alumínio (protegido da luz). Finalmente as lâminas eram lavadas em água destilada três vezes por 1min.

Foi adicionada a cada bateria de coloração uma lâmina com material normal para controle da coloração, como sendo valor 2C. Para se avaliar a integridade das células analisadas algumas amostras foram coradas pelo Fast Green 0,1%, lavadas em água destilada e examinadas no microscópio ótico.

3.5 Digestão das Amostras e Extração do DNA

As amostras de tecido mantidas em etanol/glicerol, foram lavadas 2X em etanol 70% e em PBSA e então maceradas na presença de nitrogênio líquido.

Ao macerado adicionaram-se 10 volumes de tampão de extração e transferiu-se o material para outro tubo de fundo cônico, incubando-se por 1 hora a 38°C.

Adicionou-se proteinase K para uma concentração final de 100µg/ml, colocou-se a solução de células lisadas em banho térmico por 3 horas a 50°C agitando-se levemente a solução periodicamente. Em algumas amostras usamos proteinase K para uma concentração final de 25µg/ml e aumentamos o período de incubação para 24 a 48 horas, obtendo-se resultados similares.

As amostras foram transferidas para tubos tipo Eppendorf e um volume igual de fenol destilado equilibrado com 0,5M Tris HCl (pH 8.0) foi adicionado misturando-se as duas fases por 2min. no vortex. A fase aquosa foi separada da orgânica por microcentrifugação a 5.000g por 15min. à temperatura ambiente.

Transferiu-se a solução aquosa para outro tubo de centrífuga e repetiu-se 2 vezes a extração com fenol. Finalmente a fase aquosa foi transferida para um outro tubo de centrífuga, adicionaram-se 0,2 volumes de acetato de amônio 10M, 2 volumes de etanol, à temperatura ambiente e o tubo foi homogeneizado lentamente e centrifugado a 5.000g por 15min. à temperatura ambiente. Em seguida desprezou-se o sobrenadante permanecendo o DNA precipitado no Eppendorf. O DNA precipitado foi então lavado 2 vezes com etanol a 80% por centrifugação a 5.000g por 5min. e deixado secar "overnight".

Finalmente adicionaram-se 100µl de tampão TE (pH 8,0) e o material foi deixado à temperatura ambiente por cerca de 12 horas para que ocorresse ressuspensão e então armazenado a 4°C (Sambrook et al., 1989).

3.6 Quantificação do DNA – Após Extração

Após a extração do DNA, amostras da solução estoque foram retiradas e foi realizada uma corrida em gel de agarose 0,8%, para nos certificarmos do sucesso da extração bem como para se ter uma idéia da quantidade de DNA obtido. Após a corrida o gel era corado pelo brometo de etídio e observado no transiluminador de UV. Obtinha-se um valor aproximado da concentração de DNA presente em cada amostra pela comparação da intensidade da fluorescência da amostra com a dos padrões de concentração conhecidos. Essa dosagem era suficiente para se confirmar a extração bem como para orientar a quantidade a ser usada em cada reação de PCR mas não era precisa o bastante para a realização da reação de hibridização na avaliação da amplificação do c-myc, para a qual era realizada medida por espectrofotometria. Mediu-se a absorbância da solução de DNA à 260nm e calculou-se a

concentração do mesmo, considerando-se que 1OD equivale a 50 μ g de DNA/ml. A pureza do DNA foi avaliada pela relação da absorbância a 260nm e à 280nm devendo ser maior que 1,8.

3.7 Avaliação da Amplificação do c-myc

Para avaliar a amplificação do myc usamos a técnica de “slot blot”, onde o DNA extraído das amostras foi imobilizado em membrana de nitrocelulose e hibridizado com sonda radioativa correspondente ao exon 2 do c-myc (Alitalo et al., 1983; Reed & Mann, 1985; Bonolla et al., 1988).

3.7.1 Preparo das Membranas para “Slot Blot”

Após quantificação da solução de DNA por espectrofotometria à 260nm, um volume contendo 2 η g de DNA extraído de cada amostra, conforme técnica descrita no item 3.5, foi preparado como especificado no protocolo da Amershan – Hybond N+. As amostras foram aquecidas a 95°C por 1min., resfriadas imediatamente em gelo para se impedir a renaturação. Adicionou-se 1 volume de 20X SSC a cada amostra e então foram aplicadas em duplicata às membranas de “slot blotting” sob aspiração contínua de trompa d’água utilizando-se um aparelho comercial para “slot blotting”. O poço contendo o material de cada amostra foi lavado com o dobro do seu volume em tampão e novamente filtrado. Para melhor visualização das amostras, foi acrescida pequena quantidade de “loading buffer” à solução tampão. Em seguida as membranas foram colocadas na solução de desnaturação por 5min. e transferidas para um papel de filtro embebido em solução neutralizadora, por 1min.; em seguida era realizada a fixação do DNA às membranas transferindo-as para papel de filtro embebido em solução fixadora por 20min. Finalmente as membranas eram lavadas em 5X SSPE por imersão durante 1min. e deixadas secar em papel de filtro. Posteriormente foram envolvidas em filme de PVC e estocadas a 4°C até que se procedesse à hibridização.

3.7.2 Preparo das Sondas

a) c-myc

A sonda de c-myc correspondendo ao 2º exon foi obtida a partir do plasmídeo pMC413 (pBR322+ c-myc) estocado em *E coli* HB 101 e purificado através de miniprep (item 3.7.5).

Para a purificação do inserto 40µl da miniprep (Item 3.7.5), foram digeridos com as enzimas de restrição Eco R1 e Hind III conforme especificação do fabricante e os fragmentos separados por eletroforese em gel de agarose de baixo ponto de fusão a 0,8% , por 3 horas à 70 volts. O fragmento referente ao inserto (1,4Kb) foi recortado do gel e purificado através de GeneClean (Item 3.7.5).

A sonda de c-myc foi marcada radioativamente utilizando-se [α^{32} P] dCTP (Amersham, UK) como radioisótopo, com atividade específica de 3000Ci/mMol, de acordo com o Kit Rediprime (Random Primer Labelling), Amersham Life Science, UK. Uma quantidade de 2,5ng a 50ng de DNA foram diluídos em 45µl de ddH₂O autoclavada e desnaturado por 5min. à 96°C, em seguida adicionou-se a mistura de marcação (solução tampão de dATP, dGTP, dTTP, Enzima exonuclease Klenow livre e iniciadores aleatórios), acrescido de 5µl de [α^{32} P] dCTP e incubando-se por 15min. à 37°C. A reação foi interrompida por adição de 5µl de EDTA 0,2M. Posteriormente a sonda foi purificada através de cromatografia de filtração em coluna Sephadex G-25, e eluída com TE (25mM TrisHCl pH:8,0; 1mM EDTA). Uma alíquota de 1µl da sonda foi utilizada para leitura da radioatividade incorporada em contador de cintilação líquida (Rack Beta 1214 LKB, E.U.A) e calculada a sua atividade específica (cpm/µl de DNA), obtendo-se $\sim 10^7$ cpm/µg de DNA (Sambrook et al., 1989).

b) DNA repetitivo genômico

Para a marcação do DNA repetitivo utilizou-se DNA genômico de células normais e procedeu-se conforme descrito para a sonda de c-myc assim como as condições de hibridização e exposição de autorradiografia.

3.7.3 Hibridização

As membranas contendo as amostras de DNA de cada caso, em duplicata, foram colocadas em garrafa de hibridização à 65°C, na presença de 10ml de solução de hibridização por 1 hora e então a sonda marcada radiativamente foi acrescida após desnaturação a 100°C por 5min. A hibridização procedeu-se por 12 horas à 65°C sob agitação. As membranas foram então lavadas três vezes em SSC 2X 0.1% SDS (w/V), por 10min. foram então deixadas secar e envolvidas em filme de PVC para exposição de chapa autorradiográfica (Hyperfilm βmax Amersham) à -70°C por quatro dias.

A hibridização das membranas com sonda de DNA genômico foi efetuada após a hibridização com a sonda de c-myc. Esta etapa foi precedida de lavagem das membranas com SSC 2X 0.1% SDS à 65°C até que não fosse detectada radiação através de contador Geiger. As mesmas foram então expostas por um período de dez dias para controle da radiação residual restante e então submetidas novamente à hibridização porém com DNA repetitivo genômico como sonda.

3.7.4 Leitura das Autorradiografias

As autorradiografias assim obtidas foram analisadas em programa de computador "Gel expert" (Gelexpert Software-Nucleotech). O qual mede a intensidade das bandas formadas pela exposição do DNA normal e tumoral hibridizado com a sonda radioativa de c-myc (tabela 3). Posteriormente utilizando-se a média dos valores obtidos do material normal e tumoral de cada amostra, ambos em duplicata, foi obtida uma relação entre o valor numérico da intensidade da banda tumoral pelo normal. É necessário termos um controle da quantidade de DNA em cada amostra. Para tal as membranas foram hibridizadas com o DNA genômico marcado radioativamente, e a intensidade das autorradiografias comparadas novamente entre o tecido normal e o tumoral. Foi necessário o estabelecimento de um valor de referência para a interpretação dos resultados obtidos (tabela 3) pela relação da hibridização do c-myc/hibridização do DNA repetitivo. Para tal utilizando a marcação com c-myc e DNA repetitivo apenas nas amostras do tecido normal, foi calculada a mesma relação que apresentava uma distribuição normal sendo calculado o valor médio e dois desvios padrão ficando os limites de referência entre 0,83 e 1,64. O caso 21 e o caso 22 foram desprezados por ter havido troca de material entre as duas amostras. Logo os valores obtidos com as

amostras de tecido tumoral foram comparadas com a faixa de referência calculada, para se avaliar a diferença entre os dois materiais e inferir a presença de amplificação, deleção ou não do c-myc.

Desta forma podemos avaliar quanto da diferença entre o tecido normal e tumoral deve-se a quantidades diferentes de DNA nas amostras, ou à amplificação ou deleção gênica.

Tabela 7A – Valores obtidos para a marcação de c-myc nas amostras pareadas de tecido tumoral e normal. Obs.: (Caso 99 = Caso 27; Caso 102 = Caso 28; Caso 103 = Caso 29; Caso 104 = Caso 0; Caso 106 = Caso 30; Caso 107 = Caso 3)

A m o s t r a	M y c 1	M y c 1	G e n o m i c o	G e n o m i c o	R e l a ç ã o
c 1 t	136	350	909	1450	0,43
c 1 n	352	782	989	1326	
c 2 t	706	607	176	792	1,17
c 2 n	880	1182	793	987	
c 5 t	846	1189	829	1044	1,83
c 5 n	354	663	774	937	
c 6 t	818	979	1049	1155	0,89
c 6 n	914	1178	1096	1198	
c 7 t	99	200	82	333	0,78
c 7 n	105	270	58	351	
c 8 t	1546	1663	975	1242	0,87
c 8 n	1859	2032	1119	1227	
c 9 t	348	256	464	653	1,83
c 9 n	317	182	748	951	
c 10 t	1397	1513	969	1068	1,05
c 10 n	1446	1586	1086	1155	
c 11 t	1751	1851	1096	1132	1,39
c 11 n	1131	1328	1040	1080	
c 12 t	1604	1908	1106	1097	0,81
c 12 n	2161	2256	1134	1133	
c 14 t	1937	2096	1102	1172	1,24
c 14 n	1807	1590	1224	1150	
c 15 t	1407	1125	1061	876	0,74
c 15 n	1991	1843	1143	1041	
c 15 p	2170	2011	1301	2471	0,53
c 16 t	2438	2872	1597	1663	1,04
c 16 n	1792	1820	1537	1510	
c 17 t	179	180	710	538	0,15
c 17 n	1841	1854	962	1024	
c 18 t	1898	2010	972	1138	1
c 18 n	1494	1744	840	999	
c 19 t	2332	2417	974	1102	1,02
c 19 n	2579	2428	1092	1153	
c 20 t	1995	1266	911	812	1,1
c 20 n	1637	1616	933	969	
c 23 t	1211	1241	2208	2171	0,68
c 23 n	959	865	1108	1113	
c 24 t	542	486	886	982	0,65
c 24 n	1023	848	1161	1031	
c 25 t	1530	1103	1814	1597	0,64
c 25 n	968	649	757	594	
c 26 t	1963	1615	1330	1225	1,14
c 26 n	1400	1482	1277	1074	
c 26 p	595	315	795	1415	0,33
c 99 t	1347	1435	1156	1162	1,43
c 99 n	1021	719	921	1146	
c 102 t	900	826	767	982	1,13
c 102 n	307	7	345	361	
c 103 t	1578	1314	1212	1045	0,69
c 103 n	2392	1977	1264	1086	
c 103 p	1815	1385	1088	1193	0,75
c 104 t	715	578	736	838	0,62
c 104 n	1698	1475	1266	1121	
c 106 p	1136	850	1970	1945	0,62
c 106 n	1419	994	1491	1458	
c 107 t	1247	863	1005	1085	0,78
c 107 n	1628	1570	1243	1252	
c 107 p	858	672	709	755	0,81

3.7.5 Minipreparação de Plasmídio de Bactéria (Lise Alcalina)

Inocularam-se, com apenas um toque de alça em uma colônia individualizada, 5 ml de meio LB contendo ampicilina 100 μ g/ml (estoque 1000X Conc) e incubou-se a 37°C por cerca de 16 horas. Transferiu-se a cultura para gelo até o momento da extração, para evitar lise das bactérias.

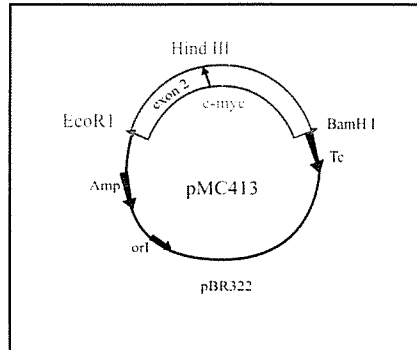
As culturas foram centrifugadas por 1min. à 5.000g. Retirou-se o sobrenadante por aspiração, sem se tocar no sedimento do fundo. Os tubos foram novamente preenchidos e centrifugados, retirando-se completamente o sobrenadante. Adicionaram-se 100 μ l de GTE a cada tubo homogeneizando-se por 3min. Adicionaram-se 200 μ l de solução de lise, seguindo-se de inversão suave e incubando-se em gelo por 5min. Adicionaram-se então 150 μ l de KOAc, agitando-se levemente, seguido de centrifugação por 4min. à 10.000g.

Um volume de 400 μ l do sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 400 μ l de isopropanol, permanecendo por 2min. à temperatura ambiente, antes de ser centrifugada por 5min.

O sedimento foi ressuspendido em 1ml de etanol 80% e centrifugado nas condições anteriores. O sobrenadante então foi descartado e o tubo invertido foi posto para secar à temperatura ambiente. O plasmídeo assim purificado foi ressuspendido em 40 μ l de TE-Rnase e incubado por 20min. à 37°C, estando pronto para posterior digestão com as enzimas de restrição.

3.7.6 Digestão com Enzimas de Restrição

Realizou-se a digestão com as enzimas de restrição Eco RI e Hind III sendo utilizada uma unidade de enzima para cada 1 μ g de DNA juntamente com o tampão comercial que a acompanha e incubado por uma hora a 37°C. Inicialmente foi feita a digestão com Hind III com uma concentração de NaCl de 50mM, em seguida acrescentou-se mais NaCl para uma concentração de 100mM e procedeu-se a digestão com Eco-RI. As etapas acima foram acompanhadas por eletroforese de alíquotas de cada digestão. Foi feita uma corrida com a primeira digestão e após a segunda digestão, sendo liberado o inserto isolado, foi usado como padrão o λ Hind III (Fig. 9).



Extração da construção pMC413 (pBR322 + c-myc)
da linhagem *E. coli* HB101



Figura 9 – Eletroferograma de digestões do plasmídeo pMC413
Canaleta 1 λ λ Hind III
2 λ Plasmídeo digerido com Hind III.
3 λ Plasmídeo digerido com Eco RI.
4 λ Plasmídeo digerido com Hind III e Eco RI.

3.7.7 Purificação de DNA de Gel de Agarose (“GeneClean”)

A banda de DNA foi recortada do gel de agarose contendo brometo de etídio, com um bisturi, sob UV de ondas longas. O bloco foi pesado e o seu volume foi calculado. Adicionou-se 3 volumes de NaCl e o material foi deixado no banho a 55°C, sob agitação, até que o gel se dissociasse completamente. Em seguida o material foi incubado em gelo por 5 minutos.

O GLASSMILK foi então agitado vigorosamente até que seu conteúdo ficasse totalmente suspenso.

A amostra com o DNA foi colocada em tubos tipo Eppendorf e adicionou-se 5 μ l de GLASSMILK à solução para cada 5 μ g de DNA. A solução foi agitada vigorosamente e cada Eppendorf foi colocado em banho de gelo sob agitação leve por 15min. Em seguida a matriz de sílica com o DNA ligado, foi precipitada em microcentrifuga por 30 segundos desprezando-se o sobrenadante.

O precipitado foi lavado 3 vezes com 500 μ l de NEW WASH gelado e centrifugado por 30 segundos em seguida eluiu-se o DNA do GLASSMILK, ressuspensando o precipitado branco com água bidestilada esterilizada em volume igual ao do GLASSMILK adicionado e o material foi incubado a 55°C por 10min. Posteriormente o material foi centrifugado por 2min. e recuperou-se um precipitado sólido.

Retirou-se cuidadosamente o sobrenadante contendo o DNA eluído e o mesmo foi colocado em um novo tubo. Finalmente 1 μ deste sobrenadante foi submetido à eletroforese em gel de agarose para sua quantificação.

3.7.8 Confeção do Gel de Agarose 0,8%

Foram adicionados 0,240g de agarose a 30ml de tampão TBE 0,5X. A mistura foi fundida em forno microondas e adicionados 5 μ l de solução 1% de brometo de etídeo. O gel de dimensão 6cm x 10cm ficou solidificando sobre uma placa de vidro nas mesmas dimensões, acrescida de um pente, durante 30min. à temperatura ambiente. O gel foi então depositado em uma cuba de eletroforese horizontal e coberto com o mesmo tampão utilizado para a confecção de gel. As amostras foram aplicadas e este foi submetido à uma diferença de potencial de 70V e 15mA durante 3 horas ou até que o indicador azul de bromo fenol atingisse o final do gel. O gel foi analisado sob luz ultravioleta 320nm (Miyoshi, 1997; Sambrook et al., 1989).

3.8 Instabilidade do Microssatélite D17S855

A reação em cadeia da polimerase foi utilizada para a amplificação do marcador polimórfico D17S855 para avaliação da presença de instabilidade desse marcador. Este loco polimórfico localizado no cromossomo 17 está ligado ao gene BRCA1. Trata-se de um marcador localizado em uma região intrônica do gene e que possui seqüências repetitivas (CA) com aproximadamente 150 pares de bases. Os iniciadores utilizados foram (Sambrook et al., 1989; Innis et al., 1990):

D17S855 (Forward) 5'GGATGGCCTTTTAGAAAGTGG 3'

D17S855 (Reverse) 3'ACACAGACTTGTCTACTGCC 5'

A reação de PCR foi realizada com 0,1 μ M dos dNTPs, 1U/reação de Taq DNA polimerase, 20ng de DNA genômico, 0,25 μ M dos iniciadores para um volume final da reação de 20 μ l, conforme apresentados na tabela 3.

Tabela 3 – Concentrações sugeridas para reação de PCR (Sambrook et al., 1989)

	Concentração recomendada	μ l/ reação	concentração final
Tampão de reação	10X concentrado	2 μ l	1X concentrado
Água bidestilada		10 μ l	
dNTPs (2,5mM)	0,02 - 0,2mM	0,8 μ l	0,1mM
Primers (5ng/ μ l)	0,1 a 0,5 μ M	3 μ l	0,25 μ M
DNA	5ng/ μ l	4 μ l	1ng/ μ l
TAQ Pol. (5U/ μ l)	0,5 - 5U/100 μ l	0,2 μ l	1U/reação
MgCl ₂	0,5 - 2,5mM		2,5 μ M
Total		20 μ l	

Foi inicialmente preparada uma mistura que continha todos os componentes da reação exceto o DNA e a Taq que foi a última a ser colocada. Esta mistura foi distribuída em “ependorfs” identificados marcados e foi acrescentado o DNA. Os tubos contendo cada reação foram colocados no termociclador PTC-100da MJ Research, nas seguintes condições: 94°C por 4min., 35 ciclos de 1min. a 94°C, 1min. à 56°C (temperatura de anelamento) e 1min. a 72°C (temperatura de extensão). No último ciclo as amostras permaneceram por 5min. à 72°C.

Após o término da reação de PCR, 15µl do material obtido de cada amostra juntamente com 3µl do “loading buffer” eram aplicados em gel de poliacrilamida 8% conforme descrito no item 3.8.1.

3.8.1 Confeção do Gel de Poliacrilamida

Um gel de poliacrilamida de 12x15cm foi preparado para a resolução dos produtos do PCR. Para a preparação do gel acrescentam-se a 10,6ml de uma solução de Bis-acrilamida (30%) 1:29, 21,4ml de água bidestilada e 8ml de tampão TBE 5X. Do volume final de 40ml de solução de acrilamida, 10ml foram separados para que fossem utilizados para vedação das placas de vidro montadas em uma cuba de eletroforese vertical. Aos 10ml foram acrescentados 250µl de solução 10% de persulfato de amônia (estocado no freezer e descongelada à temperatura ambiente no momento do uso). Logo após acrescentar a solução de persulfato de amônia, foram também acrescentados 15µl de TEMED. Os 10ml foram então depositados na parte inferior das placas de vidro com auxílio de uma seringa. A polimerização se deu em 15 minutos. Aos 30ml restantes foram adicionados as mesmas quantidades de persulfato de amônia e TEMED. Os 30ml foram depositados entre as placas de vidro, suavemente com o auxílio de uma seringa. O gel ficou polimerizando por 30 minutos à temperatura ambiente.

Após a polimerização foram acrescentados 200ml de tampão TBE 1X à parte superior da cuba e 200ml à parte inferior. Foram aplicados 15µl do produto do PCR acrescentados de 3µl de “loading buffer”. O padrão utilizado foi DNA 100pb ladder (10ng/µl). A quantidade de padrão aplicado foi de 10µl. O gel foi submetido a uma diferença de potencial de 100volts e 20mA até que a marcador azul de bromo fenol atingisse o terço inferior do gel, o que ocorria após 3,5 a 4 horas de corrida.

3.8.2 Coloração pela Prata

Após a corrida dos produtos do PCR em gel de poliacrilamida, o mesmo era retirado da cuba de eletroforese e colocado em 300ml de solução fixadora por pelo menos 10min., sob agitação suave. Quando necessário o gel permanecia nesta solução à 4°C “overnight”. Em seguida a solução fixadora era desprezada e o gel colocado na solução de Nitrato de Prata, feita no momento do uso, por 10 minutos, sob agitação. O gel era então lavado 2X em água destilada e colocado na solução reveladora por 10 minutos, ressaltando-se que o formaldeído era colocado no momento do uso. O gel era mantido nessa solução em agitação leve até que as bandas do padrão de peso molecular fossem nitidamente visualizadas para então se proceder à interrupção da reação de coloração ou seja transferindo-o novamente para solução fixadora, por no mínimo 30 minutos mas podendo ficar “overnight”. Finalmente o gel era colocado na solução de secagem por tempo semelhante ao que permaneceu na solução fixadora e montado para secar entre duas folhas de papel celofane. O gel era analisado em negatoscópio fluorescente.

A análise dos erros de replicação com o marcador polimórfico D17S855 foi realizada através da comparação do padrão de bandas obtido da amostra de tecido normal com a do tumoral. Se o tumor apresentasse uma ou mais bandas em relação às presentes no tecido normal o PCR era repetido e se fosse confirmado o achado o indivíduo era considerado positivo para erro de replicação naquele loco.

3.9 Imuno-histoquímica para p53

Como já citado no item 3.3 um fragmento das amostras obtidas, foram incluídas em blocos de parafina para análise da porcentagem de células tumorais presentes nas amostras. Desses blocos também foram feitos cortes no micrótomo de 2 a 3µm para preparo de lâminas para realização da imuno-histoquímica para p53, conforme descrito por Alves e Bacchi (1999) e descrito a seguir.

3.9.1 Preparação das Lâminas Silanização

As lâminas foram inicialmente mergulhadas em solução de detergente neutro de Extran (Merck 7553) a 0,5% em água, por 30min., lavadas em água corrente por 2 horas, no mínimo; lavadas então em água quente e colocadas para secar em estufa.

Como os tratamentos para recuperação antigênica são muito agressivos e para se evitar que os cortes descolassem das lâminas estas foram previamente preparadas com o adesivo 3-aminopropiltriétoxissilano (APTS), da seguinte forma:

As lâminas foram colocadas em imersão em acetona por 2 minutos, em seguida imersas em APTS a 4% por 2 minutos e novamente imersas (4X) em outra cuba com acetona e deixadas secar em estufa.

As fitas de parafina obtidas no processo de corte pela microtomia foram colocadas em banho térmico histológico e então depositadas nas lâminas previamente tratadas com APTS. Essas lâminas foram levadas à estufa a 60°C e deixadas por 24 horas para melhor adesão do tecidos.

Procedeu-se então à preparação dos cortes histológicos, realizando-se a desparafinização e hidratação sendo as lâminas colocadas em xilol a 60°C por 15 minutos, xilol à temperatura ambiente por 15 minutos; etanol a 100% (3X) por 30 segundos cada, etanol a 95% por 30 segundos, etanol a 80% por 30 segundos, etanol a 70% por 30 segundos e finalmente lavagem em água corrente e destilada.

A recuperação antigênica foi realizada com a incubação das lâminas em tampão citrato 10mM/pH6,0 em panela de pressão, durante 4 minutos contados a partir da fervura. Após esfriamento por 20 minutos realizou-se a lavagem em água destilada corrente.

No próximo passo procedeu-se ao bloqueio da peroxidase endógena com solução de peróxido de hidrogênio a 3% em metanol em dois banhos de 10 minutos cada, seguido pela lavagem em água corrente e destilada e em PBS.

À bateria de lâminas que estavam sendo analisadas foi acrescentada uma lâmina de material conhecido do laboratório para controle positivo e para o qual era confirmada a presença de mutação por SSCP-PCR.

Em seguida realizou-se a reação utilizando-se o complexo peroxidase antiperoxidase (PAP) conforme descrito abaixo.

As lâminas foram incubadas com anticorpo específico monoclonal, D07, diluído em tampão PBS-diluyente por 16 a 18 horas a 4°C em câmara úmida, lavadas em tampão PBS com 3 trocas de 3min. cada, incubadas com o anticorpo secundário diluído em PBS, por 30

minutos a 37°C em câmara úmida e novamente lavadas em tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada. Em seguida as lâminas foram incubadas com complexo PAP que foi obtido da mesma espécie animal do anticorpo específico, diluído em PBS, por 30 minutos a 37°C em câmara úmida, lavadas novamente em tampão PBS com três trocas de 3 minutos cada.

3.9.2 Revelação e Montagem

As lâminas foram incubadas em solução substrato (Diaminobenzidina – DAB – 60mg%) por 3 minutos a 37°C ao abrigo da luz. Em seguida observou-se ao microscópio a lâminas controle positivo, o desenvolvimento de precipitado castanho-dourado, confirma o resultado da reação. As lâminas são lavadas em água destilada por 3min., e contra coradas pelo Fast Green.

As lâminas foram imersas, rapidamente, 4 vezes em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%) lavando-se em seguida em água corrente e destilada.

Finalmente as lâminas foram desidratadas por imersão sucessivas em etanol a 50%; etanol 80%; etanol 95%; etanol 100%; xilol (3x) sendo então realizada a montagem em lâminula com Entellan (Merck 1,07961) para leitura em microscopia óptica comum.

As lâminas foram então analisadas no microscópio ótico e interpretadas conforme a intensidade da coloração de + a ++++ sendo comparadas com um controle positivo considerada fortemente marcada (++++). A localização da região de interesse era feita utilizando-se as lâminas coradas pela hematoxilina-eosina. Lâminas menos intensamente marcadas são consideradas (+++), (++), (+), ou negativas para marcação.

3.10 Soluções e Reagentes

- 1) Etanol/glicerol 1:1.
- 2) Fenol destilado equilibrado com Tris.HCl (pH:8,0).
- 3) Tampão de Extração.

10mM Tris Cl (pH 8.0)		Tris 1M	5ml
0.1M EDTA (pH 8.0)	OU	EDTA 0.5 M	20ml
20mmg/ml de RNase pancreática		SDS 10%	5ml
0.5% SDS		H ₂ O	70ml

4) Solução de Fixação:

Etanol: Clorofórmio: Ácido Acético 3:1:1

Deixar fixando por 3 a 4 minutos – usar só no dia.

5) Solução de Hidrólise:

HCl 5N – 100ml 41,4ml de HCl fumegante

48,6ml de água destilada

6) Reativo de Schiff:

100ml de água destilada fervente

0,5g de fucsina básica

15ml de HCl 1N feito na hora (13,8 de H₂O destilada e 1,2ml de HCl)

1,5g de metabissulfito de sódio

0,5g de carvão ativado

Para colocar o HCl, esperar chegar a 50°C e para colocar o metabissulfito é necessário estar à temperatura ambiente.

Guardar no escuro por 24 horas e só então colocar o carvão ativado. Guardar em geladeira e após 24 horas, filtrar.

7) TBE 5X:

Tris-HCl 54g

Ácido Bórico 27,5g

EDTA (solução estoque 0,5M) 20ml

8) Solução Fixadora:

Etanol 100ml

Ácido acético glacial 5ml

H₂O 895ml

9) Solução de Nitrato de Prata:

Nitrato de Prata 0,3g

Solução fixadora 100ml

H₂O q.s.p. 300ml

10) Solução reveladora:

NaOH (anidro)	30g
Formaldeído (37%)	3ml
H ₂ O q.s.p.	1.000ml

11) Solução de secagem:

Metanol	100ml
Ácido acético glacial	30ml
H ₂ O	120 ml

12) Solução SSPE 20 X:

3,6 M NaCl
0,2 M fosfato de sódio
0,02 M EDTA pH 7,7

13) Solução de Desnaturação:

1,5 M NaCl
0,5M NaOH

14) Solução SSC 20 X:

3M NaCl
0,3 M Na ₃ Citrato

15) Solução de Neutralização:

1,5 M NaCl
0,5 M Tris-HCl pH 7,2
0,001 M EDTA

16) Solução I:

GTE (50mM glicose, 10mM EDTA, 25mM TrisHCl, pH 8,0)

Glicose (dextrose)	0,9 g (dissolver em 50ml de água miliQ)
EDTA 0,5M	2ml
TrisHCl 1M	2,5ml
H ₂ O miliQ (q.s.p.)	100ml

17) Solução II:

solução de lise feita no momento do uso (NaOH 0,2N, SDS 1%)

Colocar 5ml de água miliQ em tubo tipo Falcon de 15ml, retire 700 μ l e adicionar 500 μ l de SDS 10% + 200 μ l de NaOH 5N. Misturar suavemente para não espumar.

18) Solução III:

KOAc (potássio 3M e acetato 5M):

Dissolver 29,442g de acetato de potássio e completar o volume para 88,5ml adicionar 11,5ml de ácido acético glacial

19) Solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 0,01M/pH7,4 (fórmula 20X concentrada)

Cloreto de sódio p.a (NaCl)	160,0g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a (Na ₂ HPO ₄)	27,31g
Fosfato de sódio monobásico di-hidratado p.a (NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O)	4,86g
Água destilada, q.s.p.	1.000ml

Para uso diluir 1/20 em água destilada e acertar o pH para 7,4.

20) Solução tampão PBS-diluyente:

Soroalbumina bovina (BSA) fração V (Sigma A9647)	1,0g
Azida sódica p.a (NaN ₃)	0,1g
Tampão PBS q.s.p.	100,0ml

21) Solução substrato-cromogênico:

Diaminobenzidina (tetracloridrato) (Sigma D5637)	0,06g
Peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) a 3%	2,00ml
Dimetilsulfóxido p.a	1,0ml
Tampão PBS q.s.p	100,0ml

22) Solução tampão citrato 10mM/pH6,0:

Ácido cítrico monohidratado p.a	2,1g
Água destilada q.s.p.	1.000,0ml

Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 2N.

23) Solução de tripsina 0,03%/pH 7,8:

Tripsina porcina tipo II (Sigma T8128)	0,030g
Cloreto de cálcio p.a	0,134g
Tampão PBS q.s.p.	100,0ml

Dissolver e acertar o pH com solução NaOH 1N.

24) Solução de formalina 10% tamponada:

Formaldeído (em solução 35 - 40%) p.a	100,0ml
Fosfato de sódio monobásico monohidratado p.a ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	4,0g
Fosfato de sódio dibásico anidro p.a (Na_2HPO_4)	6,0g
Água destilada q.s.p.	100.0ml

4 RESULTADOS

Das 41 amostras pareadas coletadas houve uma perda de 10 amostras, seja por inadequação na coleta, atraso na entrega ou término das mesmas durante padronização das técnicas a serem utilizadas. Entre as demais, duas foram desprezadas porque continham abaixo de 5% e 10% de material tumoral, respectivamente. Das 29 amostras restantes, sete chegaram ao laboratório após mais de 4 horas de terem sido coletadas e a avaliação da ploidia não foi possível nessas amostras, porém os outros aspectos foram avaliados. Em todas as 22 amostras que chegaram ao laboratório em tempo hábil foi possível a avaliação da ploidia, o que mostrou uma boa eficácia da metodologia usada.

Das 29 amostras analisadas 65,5% provinham de pacientes do sexo feminino (Graf.1), a idade média foi de 61,7 anos com desvio padrão de 16,7 anos, contudo essa diferença não foi significativa ($p = 0,136$), ou seja, as proporções de pacientes do sexo masculino e feminino não são significativamente diferentes de 50,0%, que é em média o que se encontra na literatura (Graf.1). Houve predominância de tumores esporádicos (89,7%) e os familiares representaram 10,3%, valores esses dentro da faixa relatada na literatura. Além disso, é possível que algum caso com história familiar não tenha sido notificado, uma vez que alguns pacientes não conhecem com precisão sua história familiar. A maioria dos tumores estavam distais ao ângulo esplênico do cólon (82%) e desses 47,8% (Graf.3) eram de reto. Houve 15 casos de tumor avançado, estágio III e IV, e 13 casos de tumor mais inicial estágio I e II, em 1 paciente não havia tumor somente pólipos (Graf.4). O CEA estava elevado em 57,1% dos pacientes com tumores (Graf.6). A maioria dos tumores analisados apresentavam grau de diferenciação moderado (78,6%) (Graf.5).

Na análise microscópica das amostras, para avaliação da quantidade de material tumoral, obtivemos um grupo de 22 amostras que praticamente só apresentavam tecido tumoral, e que foram consideradas em conjunto. Desse conjunto, 12 apresentavam cerca de 100% de tecido tumoral (Fig.10); 3 em torno de 90%; e 7 em torno de 80%. Em outros 4 casos tínhamos amostras com cerca de 40% de células e o restante era formado por tecido desmoplásico, mas as células presentes nas amostras eram basicamente de tecido tumoral (Fig.11), sendo portanto, consideradas adequadas. Em três casos as amostras apresentavam cerca de 65% de tecido tumoral, e estavam dentro do recomendado, acima de 60%.

Duas amostras apresentavam uma proporção muito baixa entre tecido tumoral e normal (5% e 10% respectivamente), as células tumorais estavam muito envolvidas por tecido normal, o que tornaria a microdissecção quase impossível, por isso optou-se por desprezá-las (Fig.12) (Tab.2 e 3). Nas amostras analisadas não houve relação entre a porcentagem de células tumorais e o estadiamento do tumor.

Tabela 4 – Apresentação da relação entre as variáveis analisadas, dados clínicos e histopatológicos.

No Caso	Sexo	Idade	Localização	Estádio	Grau de dif. hist.	CEA	Ploidia	p53	c-myc
0	M	45	Colon D	III	mod.	↑	D	+	↓
1	F	73	Colon D	III	indif.	↑	D	-	N
2	F	74	Colon E	II	Mod.	↑	D	+	N
3*	F	32	Colon E	II	indif.	N	-	-	↓
5	M	78	Colon E	II	mod.	N	tetrap	-	↑
6	F	71	Colon E	I	mod.	N	D	+	N
7	F	69	colon E	II	bem	N	hiperp	+	↓
8♦	F	65	colon E	I	bem	↑	hiperp	+	N
9	M	57	colon E	III	mod.	↑	D	-	↑
10	F	56	colon E	III	mod.	↑	D	-	N
11	F	53	colon E	IV	mod.	N	hipopl	-	N
12♦	F	74	colon E	II	mod.	↑	hiperp	+	↓
14	M	81	colon E	III	mod.	N	hiperp	-	N
15	M	81	colon E	IV	mod.	↑	D	+	↓
16	F	62	colon E	III	mod.	↑	D	+	N
17	F	74	colon E	II	bem.	N	hiperp	+	↓
18*	F	70	colon D	II	mod.	↑	-	-	N
19	M	58	colon D	III	mod.	↑	tetrap	-	N
20	M	72	colon E	II	mod.	N	tetrap	-	N
21♣	F	72	colon E	III	mod.	↑	D	-	Excluído
22*	F	59	colon E	II	mod.	N	-	-	Excluído
23	F	77	colon E	III	mod.	↑	D	+	↓
24	M	45	colon E	IV	mod.	↑	D	-	↓
25	F	65	colon E	II	mod.	N	hiperp	-	↓
26	M	24	colon E	III	mod.	N	D	+	N
27*	F	62	colon E	I	mod.	N	-	-	N
28*	F	29	colon D	III	mod.	↑	-	-	N
29* ♣	F	81	colon E	III	ind.	↑	-	-	↓
30	M	29	polipose	-	-	-	-	-	↓

* Amostras sem análise de ploidia. - Não realizado. N - Normal

♣ Pacientes com relato de tumor metacrônico.

♦ Pacientes operados na urgência.

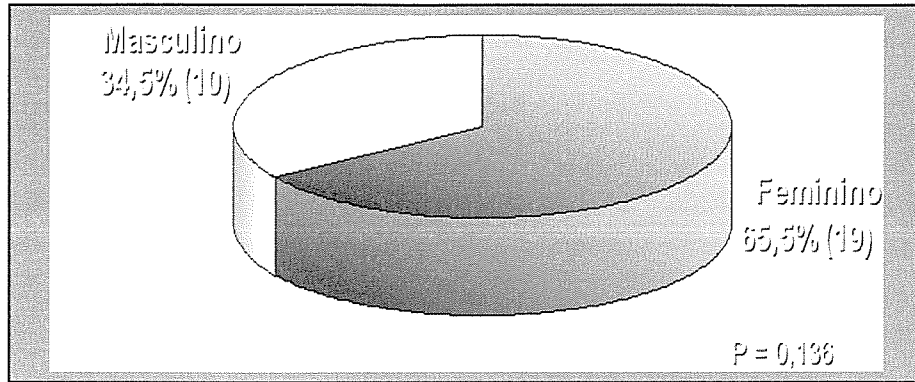


Gráfico 1 – Caracterização dos casos com relação ao sexo
Nota: O valor absoluto está apresentado entre parênteses

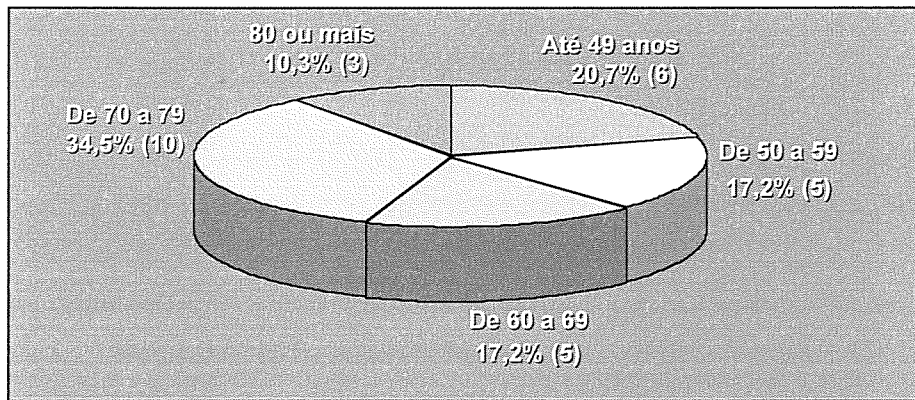


Gráfico 2 – Caracterização dos casos com relação à faixa etária

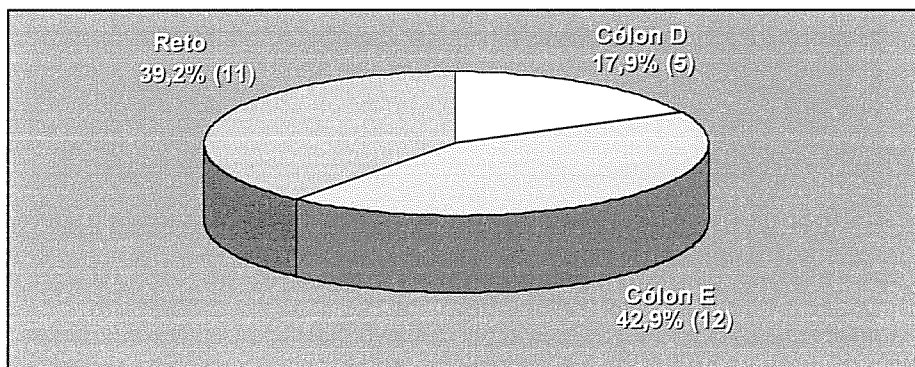


Gráfico 3 – Caracterização dos casos com relação à localização

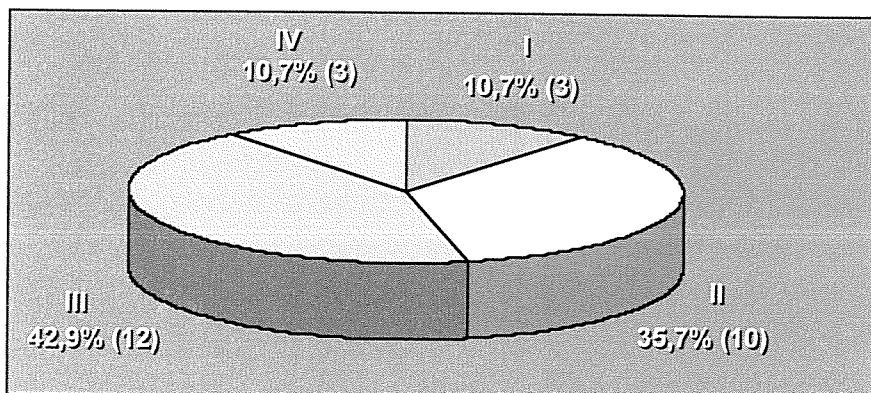


Gráfico 4 – Caracterização dos casos com relação ao estágio

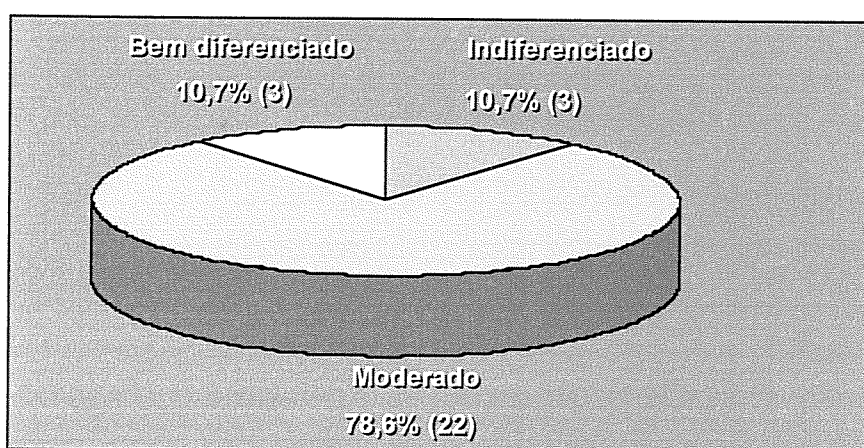


Gráfico 5 – Caracterização dos casos com relação ao grau de diferenciação histológica

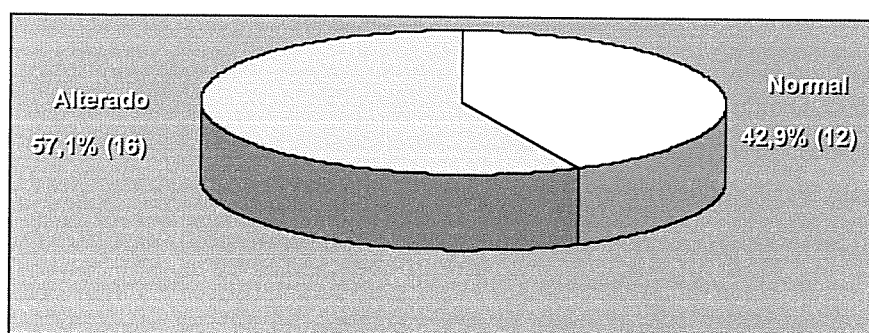


Gráfico 6 – Caracterização dos casos com relação ao CEA

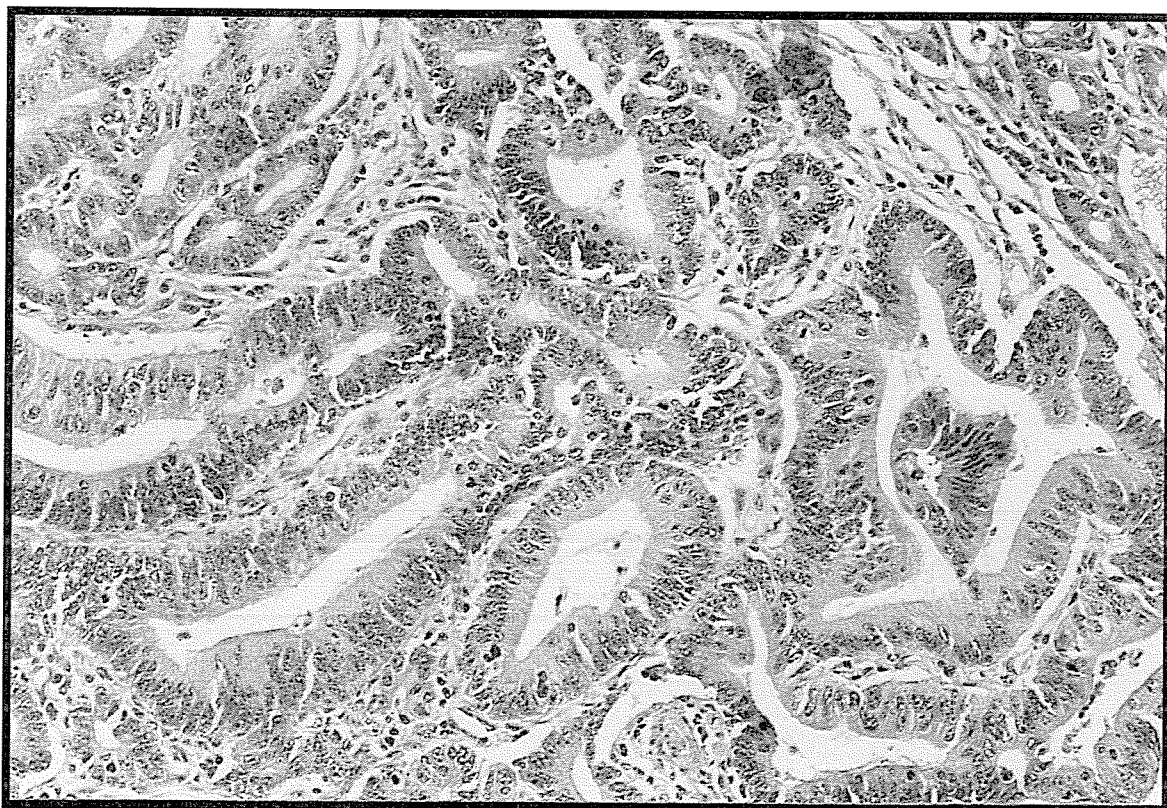


Figura – 10 – Corte histológico de Carcinoma Colorretal proveniente do caso 1 – Material corado com HE (mat. método item 3.3) mostrando alto percentual de células neoplásicas. (Ampliação – 40X)

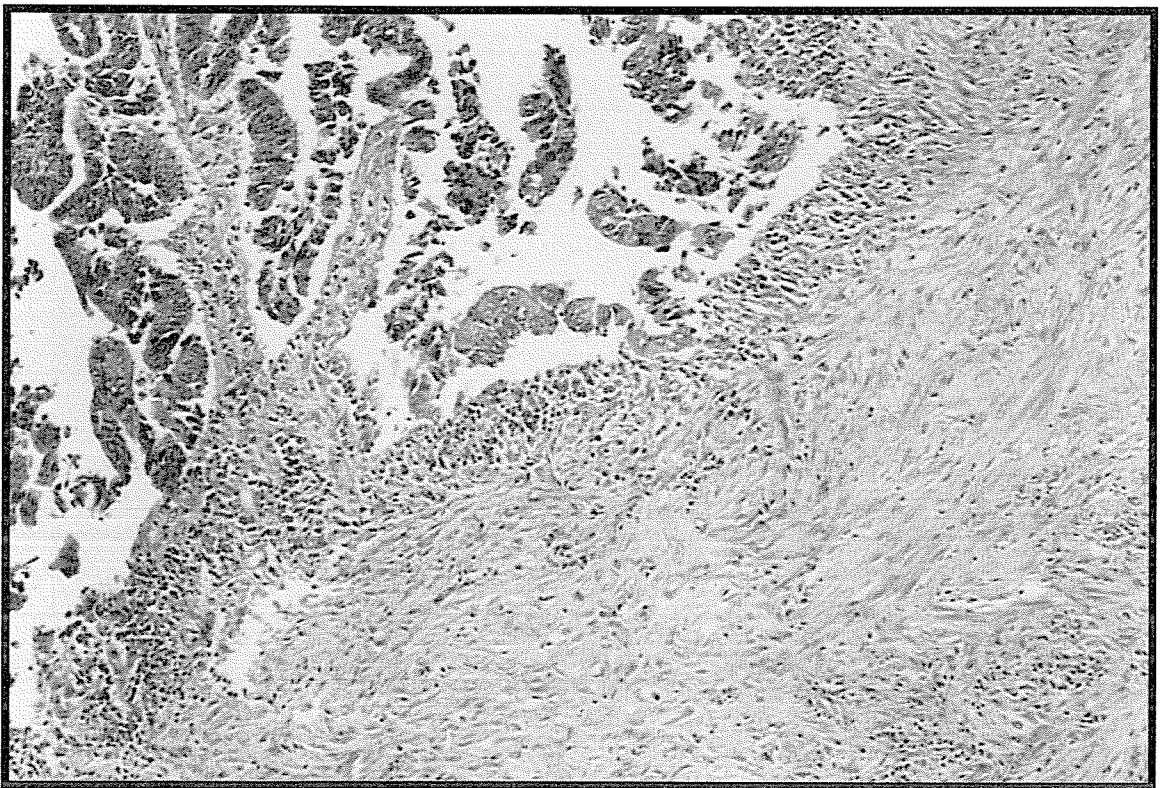


Figura 11 – Corte histológico de Carcinoma Colorretal proveniente do caso 6 – Material corado com HE (mat. método item 3.3) mostrando cerca de 40% de células tumorais e com abundante tecido desmoplásico. (Ampliação – 40X)

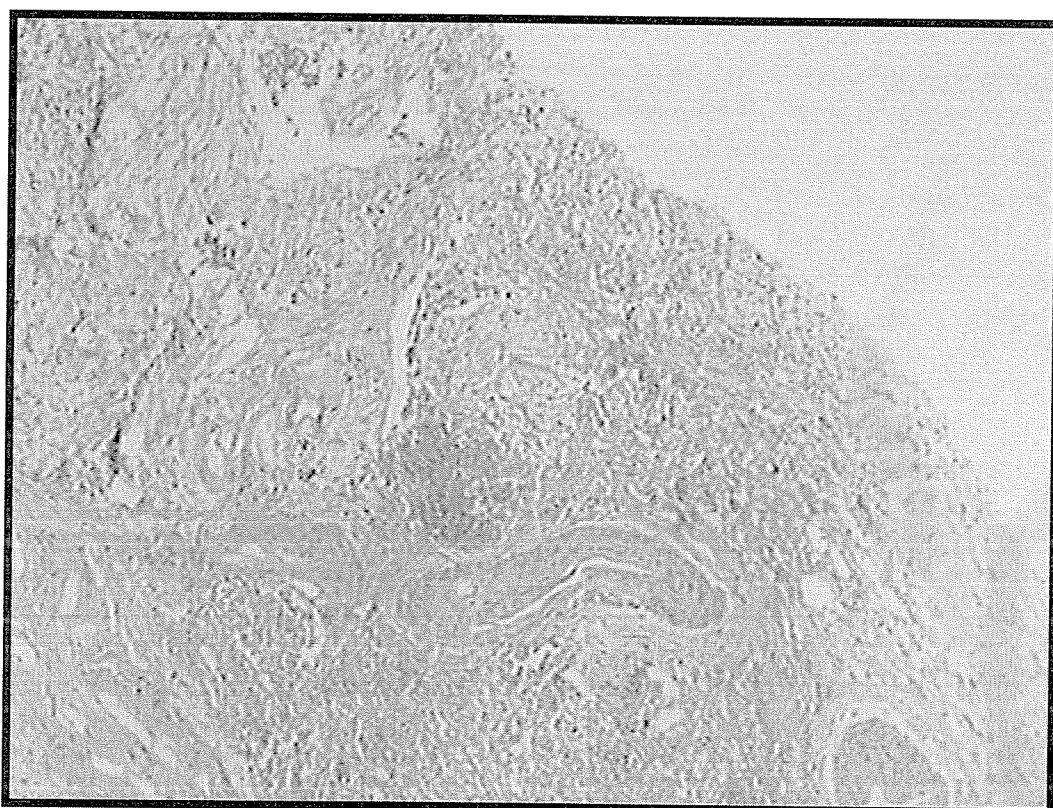


Figura 12 – Corte histológico de Carcinoma Colorretal proveniente do caso 4 – Material corado com HE (mat. método item 3.3), mostrando pequenas áreas de tecido tumoral envolvido por tecido normal, tornando a microdissecção muito difícil, sendo a mesma desprezada. (Ampliação – 40X)

Tabela 5 – Análise comparativa do estágio com relação à ploidia

Variável	Estádio	n	Medidas Descritivas				p	Conclusão
			Min.	Máx.	Média	d.p.		
Ploidia	Inicial	9	1,98	4,59	2,98	0,79	0,0	I = A
	Avançado	13	1,61	3,56	2,34	0,57		

Nota: O valor de p refere-se à probabilidade de significância do teste Kruskal-Wallis

Legenda: I → Inicial (Estádio I e II)

A → Avançado (Estádio III e IV)

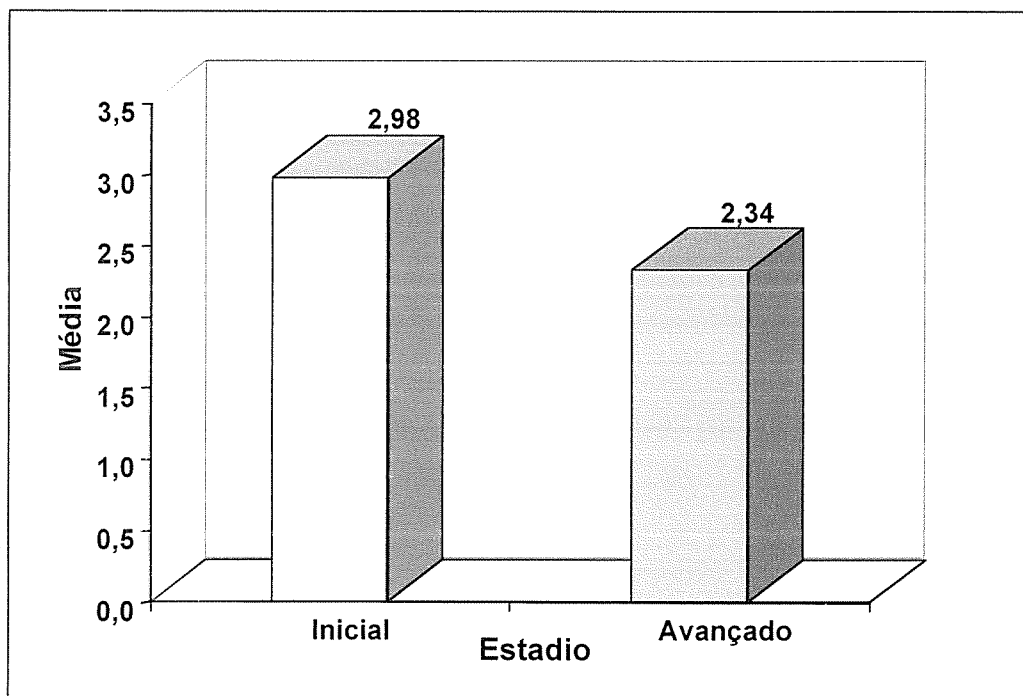


Gráfico 7 – Análise comparativa do estágio com relação à medida da ploidia

4.1 Avaliação da Ploidia do DNA

Em 22 pacientes foi possível realizar a avaliação da ploidia do DNA comparando-se os valores obtidos nas lâminas controle do tecido normal com o tecido tumoral.

De acordo com os critérios já descritos a amostra foi considerada aneuplóide em 09 pacientes (40,9%), sendo que destes 6 casos (27,3%) foi hiperdiplóide, em 2 casos (9,1%) foi tetraplóide e em 1 caso (4,5%) foi hipodiplóide (Graf.8). Não houve casos de hipertetraplóides. Entre os pacientes com ploidia alterada a média de idade foi de 70,6 anos e entre aqueles com ploidia normal foi de 60,7, porém esses valores não alcançaram significado estatístico. Não houve diferença na ploidia entre pacientes abaixo ou acima de 50 anos (Tab. 10).

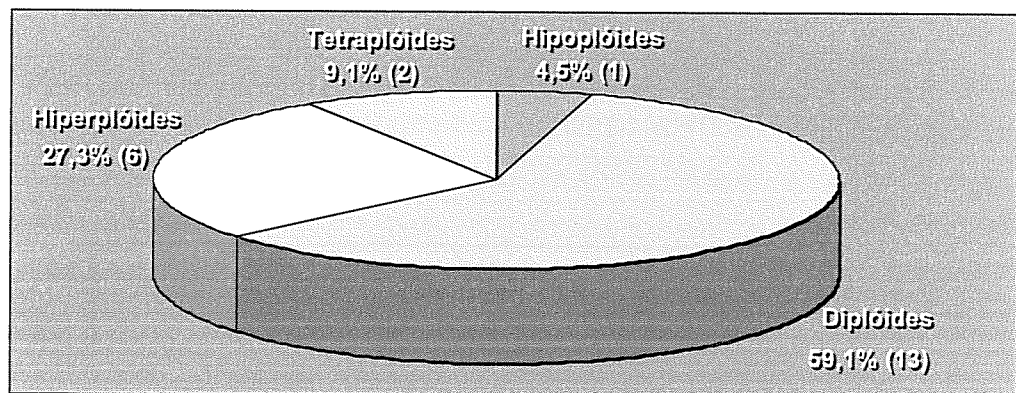


Gráfico 8 – Análise do conteúdo de DNA em amostras de carcinomas colorretais utilizando citometria estática

Foi também realizada a classificação do material segundo a distribuição em um histograma de pontos conforme critérios descritos. Os padrões de gráficos obtidos para o tecido tumoral foram 13 do tipo I, 3 do tipo II, em 1 caso observou-se um padrão tipo III e em 5 o tipo IV.

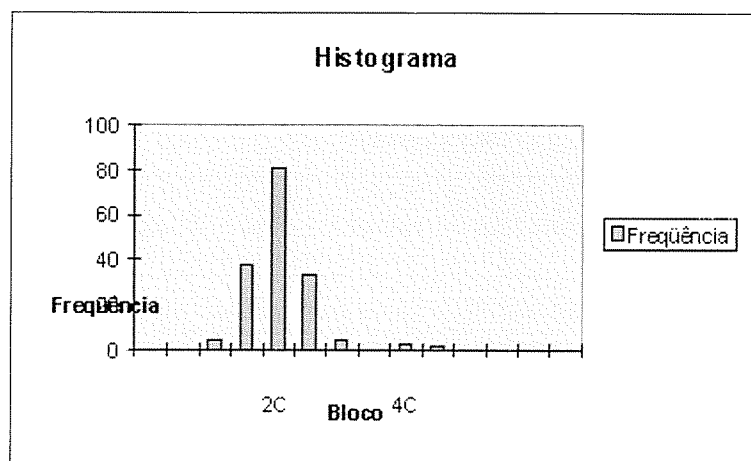


Gráfico 9 – Caso controle – tecido normal – Histograma normal com a distribuição da grande maioria das células em torno de 2C. Representa o padrão verificado nas células de tecidos normais.

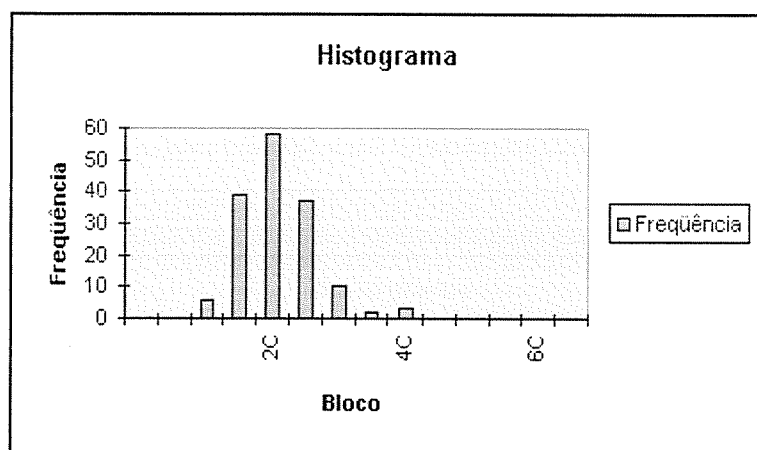


Gráfico 10 – Histograma tipo I – caso 6 tumor – pico modal único na região 2C com poucas células se desviando do normal.

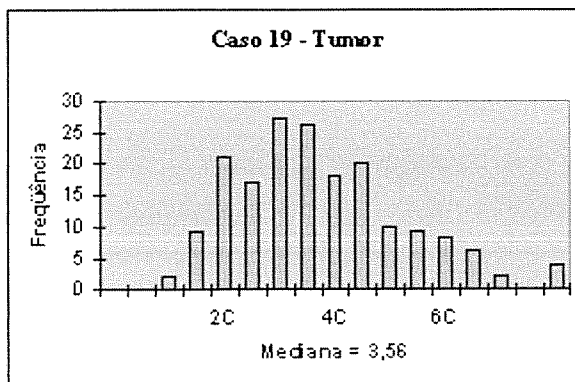


Gráfico 11 – Histograma Tipo II – caso 19 tumor – valor modal próximo à região tetraplóide além do pico ao redor de 2C.

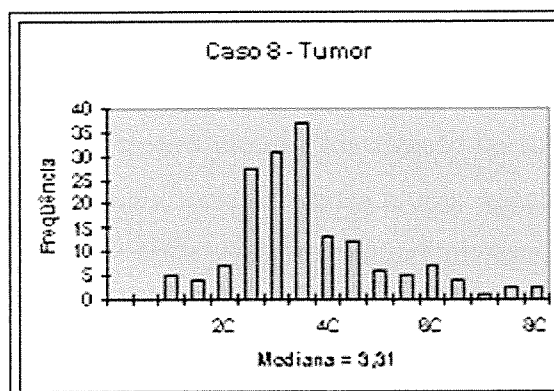


Gráfico 12 – Histograma tipo III – caso 8 tumor – Apresenta dois picos, mas difere do tipo II pelo desvio dos valores 2C e 4C.

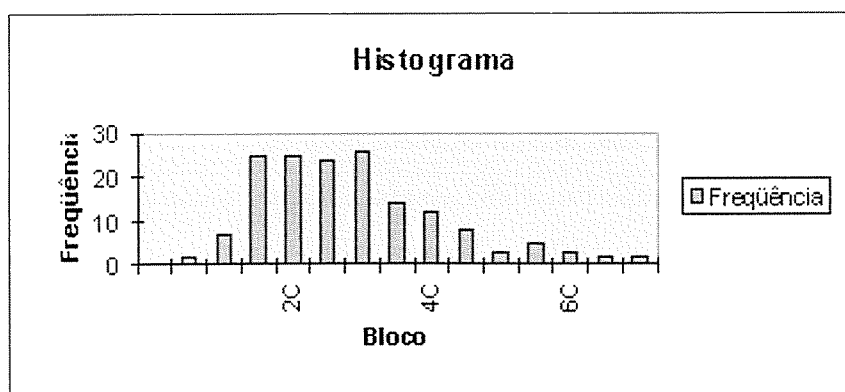


Gráfico 13 – Histograma Tipo IV – caso 7 tumor – Histograma com evidência de pronunciada e irregular aneuploidia com quantidade de DNA por célula variando de níveis próximos a 2C à valores próximos a 6C ou mesmo 8C.

Na tabela abaixo podemos verificar a distribuição dos casos de acordo com a avaliação da ploidia e com o padrão dos histogramas.

Tabela 6 – Avaliação da ploidia em 22 amostras, comparando-se o valor da ploidia com o histograma correspondente. *Hipodiplóide

Caso	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	23	24	25	26	0
valor ploidia	2,3	2,3	4,6	1,9	2,6	3,3	2,0	1,9	1,6	2,9	3,4	1,8	2,4	2,8	3,6	3,5	2,4	2,5	2,3	3,2	2,2	2,0
Diplóide	X	X		X			X	X	X*			X	X				X	X	X		X	X
Hiperploide					X	X				X	X			X							X	
Tetraploide			X												X	X						
Histograma	I	I	II	I	IV	III	I	I	I	I	IV	I	I	IV	IV	IV	I	I	II	II	I	I

Não se observou relação entre a ploidia, localização do tumor, grau de diferenciação, níveis de CEA ou sexo. Houve uma forte tendência a uma relação entre valores maiores da ploidia com tumores em estádios mais iniciais e valores menores com tumores em estádios mais avançados ($p=0,072$) (Tab.5 e 10) (Graf. 7).

4.2 Extração do DNA

Das 31 amostras que foram levadas ao laboratório em tempo hábil foi possível a extração do DNA com sucesso em 30 casos, o que evidencia uma alta taxa de eficácia do método usado. Utilizando-se um fragmento de tecido normal e tumoral de aproximadamente $1,0\text{cm}^3$ foi possível extrair DNA em quantidade suficiente para a análise proposta em todos os casos. Nas amostras analisadas a quantidade de DNA extraído variou de $8,33\mu\text{g}$ até $1187\mu\text{g}$ com uma média de $629,34\mu\text{g}$ para o tecido tumoral e $346,15\mu\text{g}$ para o tecido normal.

4.3 Amplificação do c-myc

Em 29 amostras foi realizada avaliação da amplificação do c-myc como já citado utilizando-se uma sonda para uma região exônica do gene. Em dois casos não houve sucesso na hibridização, coincidentemente nos casos que foram desprezados devido à pequena quantidade de material tumoral. A hibridização foi visualizada em filme para autorradiografia.

O controle para a avaliação da quantidade de DNA presente nas amostras foi feito através da hibridização das mesmas membranas com o DNA genômico. Para a avaliação da amplificação ou não do c-myc, bem como para avaliar sua deleção nas amostras de tecido tumoral, os valores numéricos obtidos pela intensidade da coloração dessas bandas, em duplicata, nas auto radiografias analisadas no computador (Tab.7A) foram comparadas com os valores obtidos nas bandas de tecido normal. Calculou-se o erro padrão para a relação entre cada amostra de tecido normal em duplicata, hibridizado com a sonda de c-myc e de DNA genômico, conforme item 3.7.4 para se estabelecer o quanto da diferença obtida, quando comparado com o tecido tumoral era devido a artefato da técnica ou a alterações no número de cópias do gene (Tab. 7B).

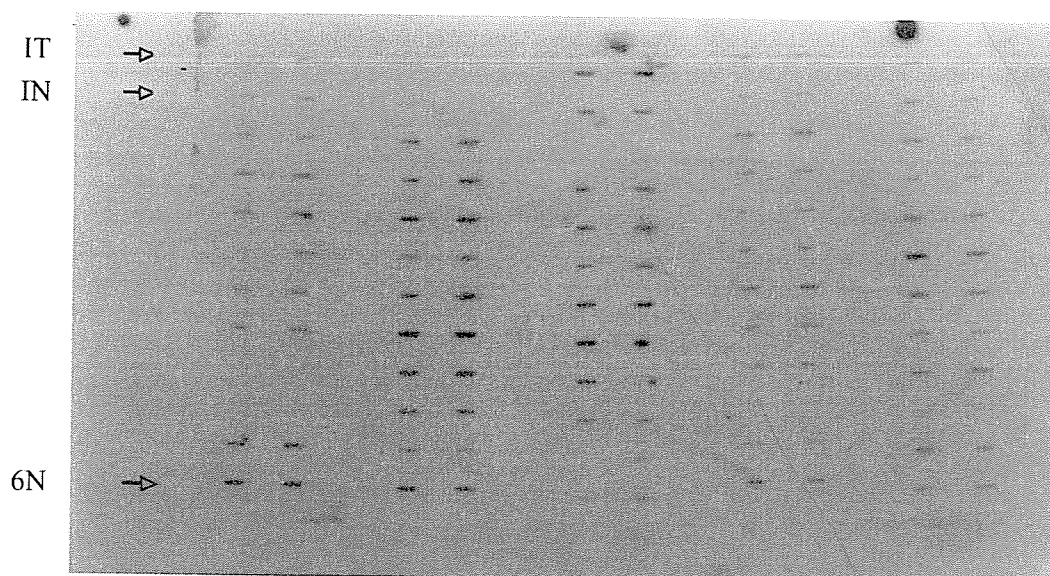


Figura 13 – Autorradiografia mostrando a intensidade da marcação do DNA de tecido normal e tumoral pela hibridização com sonda para c-myc.

As amostras do canto superior esquerdo correspondem à hibridização do material do caso 1 normal. As amostras da linha inferior correspondem ao material do caso 1 tumoral e assim sucessivamente (caso 2 normal e tumoral, caso 3 normal e tumoral, [...] caso 5, caso 6, caso 7, caso 8, caso 9, caso 10, caso 11, caso 12, caso 14, caso 15, caso 16, caso 17, caso 18, caso 19, caso 20, caso 21, caso 22, caso 23, caso 24, caso 25, caso 26, caso 27, caso 28, caso 29 e caso 30 normal e tumoral).

Os resultados da relação da hibridização entre tecido normal e tumoral corrigido pela quantidade de DNA e com base na faixa de referência já descrita, está colocado na tabela seguinte:

Tabela 7 B – Valores obtidos pela relação tecido tumoral/tecido normal para a hibridização de *c-myc*.

Casos	1	2	3	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15T	16	17	18
amplif. <i>c-myc</i>	0.43	1.17	0.78	1.83	0.89	0.78	0.87	1.83	1.05	1.39	0.81	1.24	0.74	1.4	0.15	1.0

Casos	19	20	21	22	23	24	25	26T	27	28	29	0
amplif. <i>c-myc</i>	1.02	1.10	0.37	1.78	0.68	0.65	0.64	1.14	1.43	1.13	0.63	0.62

casos (pólipos)	3	15	26	29	30
amplif. <i>c-myc</i>	0.81	0.63	0.33	0.75	0.62

O *myc* foi considerado normal em 42,85% (13 casos) e alterado em 50% (15 casos) sendo que em 3 casos (10,7%) estava amplificado e em 46,1 (12%) estava com um valor abaixo do esperado. Todos os casos de pólipos apresentaram valores abaixo do considerado normal, (Graf. 14).

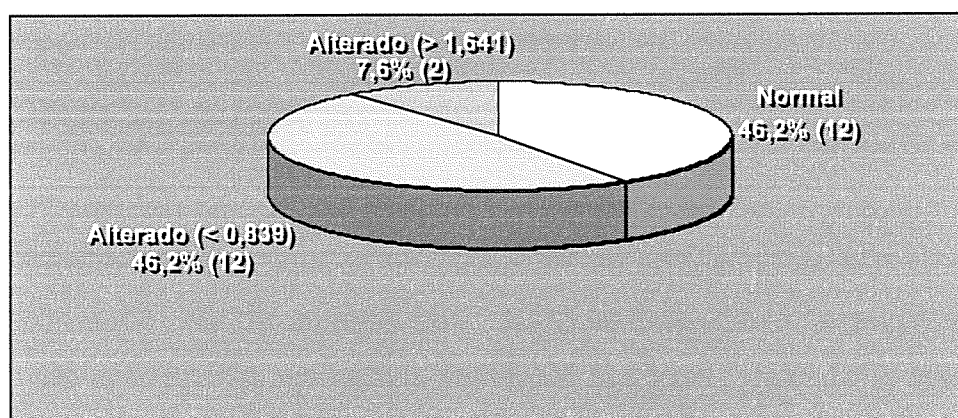


Gráfico 14 – Caracterização dos pacientes quanto ao resultado da hibridização do *c-myc*.

Nota: Alterado → Inferior à 0,839 (média do tecido normal – 2 d.p. da média) ou Superior à 1,641 (média do tecido normal +2 d.p. da média)

Não houve associação entre alteração ou normalidade do *myc* e média de idade, sexo, estágio, níveis de CEA localização do tumor ou grau de diferenciação. Observou-se (conforme podemos notar na tabela 13 e gráfico 16) que houve uma discreta associação entre

aumento do valor da ploidia e aumento dos índices de amplificação do c-myc com um índice de correlação de Pearson de 0,40 (Tab.13). Além disso houve uma tendência a uma associação entre idade maior que 50 anos e maiores da relação de c-myc (Tab. 9).

4.4 Instabilidade do Microsatélite D17S855

Em todas as amostras foi possível a amplificação do loco polimórfico D17S855, após estabelecimento das condições ideais do PCR. Todas as 30 amostras analisadas eram heterozigotas para a região estudada. As bandas provenientes de cada par de amostras apresentaram um padrão semelhante de corrida para o tecido normal e tumoral, sem o aparecimento de bandas extras ou perdas alélicas em 29 dos casos analisados. Em uma amostra correspondente ao caso 1, houve a formação de bandas em níveis diferentes de corrida quando comparamos o material normal e tumoral (Fig.14). Nesse caso a reação de PCR foi repetida confirmando-se esta diferença. Em três casos havia tecido normal, tumoral e de pólipos e o padrão obtido nas amostras do mesmo paciente foram muito semelhantes e no paciente com polipose e sem tumor a relação entre tecido normal e do pólipos também foi muito semelhante.

4.5 Imuno-histoquímica para p53

Nas 22 amostras em que foi possível a avaliação da ploidia realizamos também a imuno-histoquímica para p53, através da colaboração do laboratório do professor Eduardo Bacchi de Botucatu/SP. Nas 22 amostras analisadas 11 amostras foram fortemente marcadas, 10 amostras não apresentaram marcação e uma ficou fracamente marcada. A marcação foi comparada com uma lâmina controle de tumor de mama que é fortemente marcada e na qual se sabe que há uma mutação do gene p53. Nas lâminas do laboratório para pesquisa de alterações do p53 em tumores de mama, encontrou-se uma correspondência entre os casos positivos (++++) de 100% com uma mutação no p53, detectada por SSCP-PCR, ao passo que naquelas lâminas positivas (+++), cerca de 70% apresentavam mutações.

A proteína do p53 é detectada por imuno-histoquímica quando mutada, por tornar-se estável, pode também ficar estável por interação com outros fatores (mdm2, proteínas do HPV), nesses casos, mesmo sem mutações, podendo levar a um resultado falso positivo, na imuno-histoquímica.

Tabela 8 – Resultado da imuno-histoquímica para p53

CASO	0	1	2	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17	19	20	21	23	24	25	26
imuno	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+-	-	-	+	-	-	+

Como podemos observar houve alteração do p53 com acúmulo de proteína detectada pela imuno-histoquímica em 50% das amostras analisadas (Fig.15), em 45,4% não houve alteração (Fig. 16) e em 1 caso (4,5%) (Fig.17) houve uma marcação fraca.

Não houve relação entre a positividade ou não de p53 com estágio, níveis de CEA, localização do tumor, sexo, idade e grau de diferenciação histológica conforme podemos observar na tabela 12.

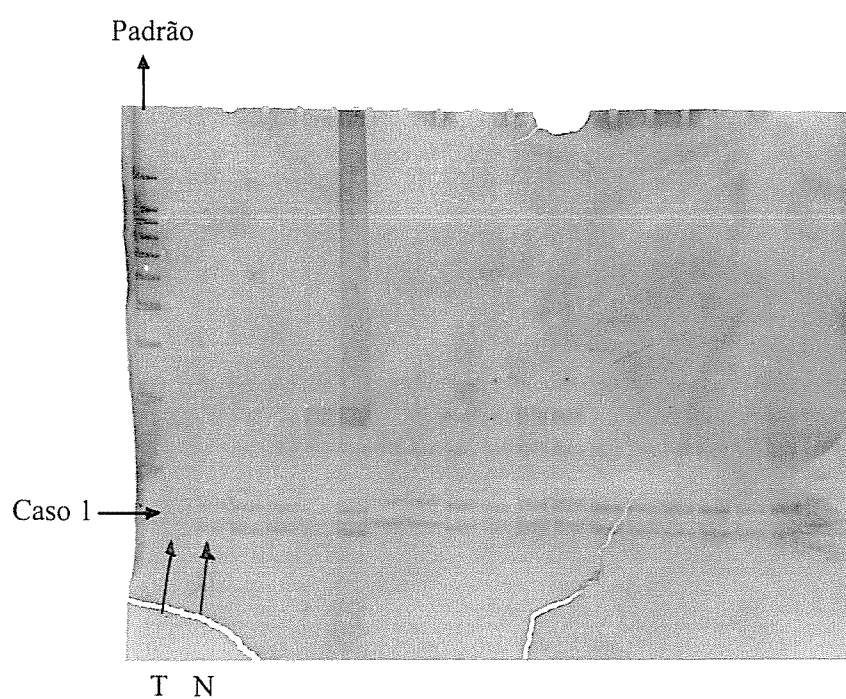


Figura 14, – Eletroferograma dos produtos de PCR resolvidos em gel de acrilamida 8% e corado pela prata.

Caso 1 (canaleta 1 tumor, canaleta 2 normal); Caso 2 (canaleta 1 tumor, canaleta 2 normal);
Caso 3 (canaleta 1 tumor, canaleta 2 normal); Caso 5 (canaleta 1 tumor, canaleta 2 normal); e
assim sucessivamente até o Caso 12.

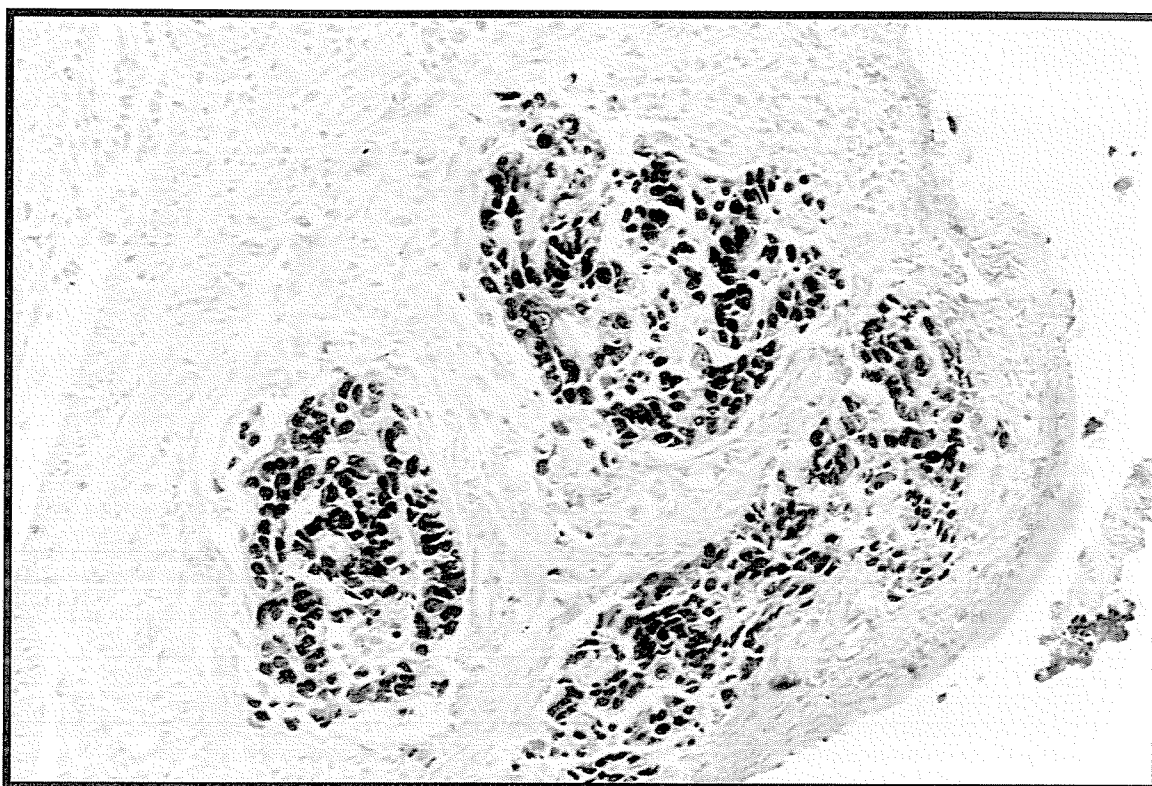


Figura 15 – Caso “0” – Carcinoma Colorretal. Imuno-histoquímica positiva para p53 peroxidase antiperoxidase – PAP – p53 50X.



Figura 16 – Caso 5 – Lâmina de amostra de tecido tumoral mostrando reação de imunohistoquímica negativa para p53.



Figura 17 – Caso 19 – Lâmina de amostra de tecido tumoral mostrando reação de imunohistoquímica fracamente positiva para p53.

Tabela 9 – Análise comparativa do sexo com relação à variável myc.

Nota: O valor de p refere-se à probabilidade de significância do teste Kruskal-Wallis

Legenda: 1 → < 50 anos

2 → > 50 anos

Variável	Sexo	n	Medidas Descritivas				p	Conclusão
			Min.	Máx.	Média	d.p.		
MYC	< 50 anos	6	0,33	1,13	0,69	0,26	0,080	1 = 2
	> 50 anos	23	0,15	2,70	1,08	0,58		

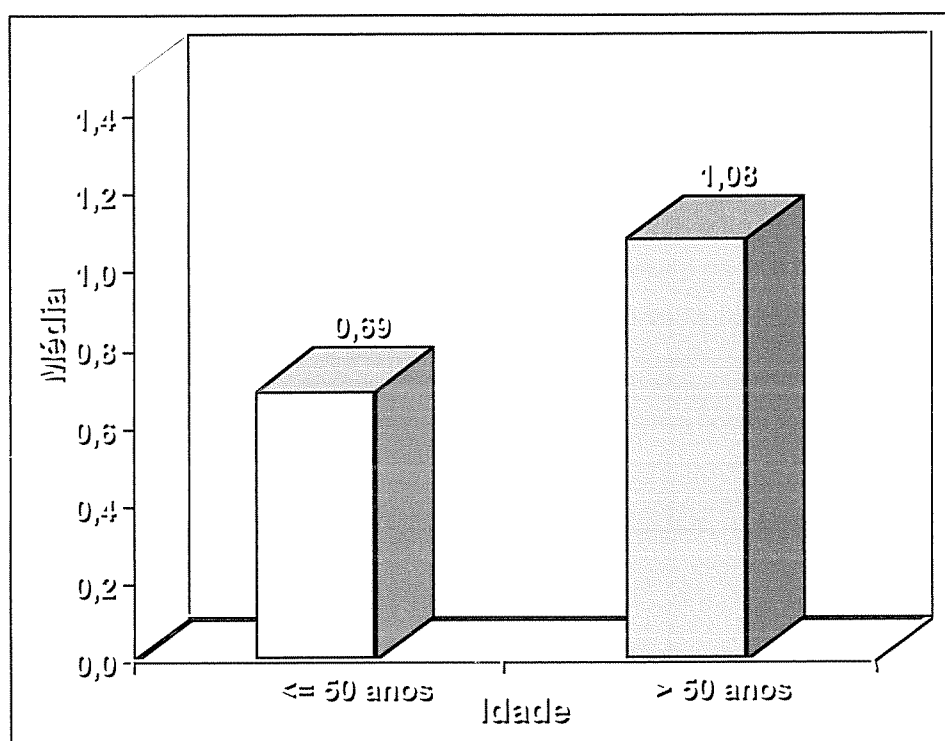


Gráfico 15 – Caracterização das variáveis c-myc com relação à média de idade

Tabela 10 – Análise comparativa das medidas da ploidia com relação às variáveis de Interesse.

Nota: O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher (Normal = diplóide)

Foi considerado significativo $p < 0,05$

Variável	Ploidia				Total	P
	Normal		Alterada			
	n	%	N	%		
Estádio						
Inicial	3	33,3	6	66,7	9	0,192
Avançado	9	69,2	4	30,8	13	
CEA						
Normal	4	44,4	5	55,6	9	0,666
Alterado	8	61,5	5	38,5	13	
Cólon						
Direito	2	66,7	1	33,3	3	1,000
Esquerdo	10	52,6	9	47,4	19	
Região						
Cólon E	4	40,0	6	60,0	10	0,656
Reto	5	55,6	4	44,4	9	
Sexo						
Feminino	7	53,9	6	46,1	13	1,000
Masculino	5	55,6	4	44,4	9	
Idade						
≤ 50 anos	3	100,0	0	0,0	3	0,221
> 50 anos	9	47,4	10	52,6	19	
Grau						
1	1	100,0	0	0,0	1	—
2	10	55,6	8	44,4	18	
3	1	33,3	2	66,7	3	

Tabela 11 – Análise comparativa das medidas do myc com relação às variáveis de interesse

Nota: O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher. Foi considerado significativo $p < 0,05$

Variável	MYC				Total	p
	Normal		Alterado			
	n	%	N	%		
Estádio						
Inicial	5	41,7	7	58,3	12	1,000
Avançado	6	42,9	8	57,1	14	
CEA						
Normal	4	36,4	7	63,4	11	0,701
Alterado	7	46,7	8	53,3	15	
Cólon						
Direito	3	37,3	8	72,7	11	0,353
Esquerdo	8	72,7	13	86,7	21	
Região						
Cólon E	5	62,5	3	37,5	8	0,667
Reto	6	46,2	7	53,8	13	
Sexo						
Feminino	9	52,9	8	47,1	17	0,124
Masculino	2	20,0	8	80,0	10	
Idade						
≤ 50 anos	1	16,7	5	83,3	6	0,350
> 50 anos	10	47,6	11	52,4	21	
Grau						
1	0	0,0	3	100,0	3	
2	10	50,0	10	50,0	20	—
3	1	33,3	2	66,7	3	

Tabela 12 – Análise comparativa das medidas do p53 com relação às variáveis de interesse.

Nota: O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

Variável	P53				Total	p
	Normal		Alterado			
	n	%	n	%		
Estádio						
Inicial	3	33,3	6	66,7	9	0,387
Avançado	8	61,5	5	38,5	13	
CEA						
Normal	5	55,6	4	44,4	9	1,000
Alterado	6	46,2	7	53,8	13	
Cólon						
Direito	2	66,7	1	33,3	3	1,000
Esquerdo	9	47,4	10	52,6	19	
Região						
Cólon E	3	33,3	6	66,7	9	0,370
Reto	6	60,0	4	40,0	10	
Sexo						
Feminino	5	38,5	8	61,5	13	0,387
Masculino	6	66,7	3	33,3	9	
Idade						
≤ 50 anos	1	33,3	2	66,7	3	1,000
> 50 anos	10	52,6	9	47,4	19	
Grau						
1	1	100,0	0	0,0	1	
2	10	55,6	8	44,4	18	—
3	0	0,0	3	100,0	3	

Tabela 13 – Análise da correlação entre as medidas do myc e da ploidia.

Variável	Correlação	p
MYC	0,40	0,064
Ploidia		

Gráfico 16 – Análise de correlação das medidas de ploidia e myc

Nota: O valor de p refere-se ao teste de significância da correlação de Pearson (r)

Tabelas de cruzamentos dos testes

Tabela 14 – Análise comparativa do myc com o p53

Nota: $p = 1,000$ (O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher)

MYC	P53				Total
	Normal		Alterado		
	n	%	n	%	
Normal	4	50,0	4	50,0	8
Alterado	6	46,2	7	53,8	13
Total	10		11		21

Tabela 15 – Análise comparativa do myc com a ploidia

Nota: $p = 1,000$ (O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher)

MYC	Ploidia				Total
	Normal		Alterado		
	n	%	n	%	
Normal	4	50,0	4	50,0	8
Alterado	7	53,8	6	46,2	13
Total	11		10		21

Tabela 16 – Análise comparativa do p53 com a ploidia

Nota: $p = 1,000$ (O valor de p refere-se ao teste exato de Fisher)

P53	Ploidia				Total
	Normal		Alterado		
	n	%	n	%	
Normal	5	50,0	5	50,0	10
Alterado	6	54,6	5	45,4	11
Total	11		10		21

5 DISCUSSÃO

Ao iniciarmos esse estudo observamos logo de início as dificuldades em se aproximar a prática clínica diária com aspectos da biologia básica e seus avanços recentes. Essas dificuldades iam desde a informação, disponibilidade e preparo das pessoas inicialmente envolvidas, passando por diferenças na linguagem rotineiramente utilizada e até mesmo em relação à distância física entre as instituições envolvidas.

Inicialmente solicitamos o acondicionamento do material nos respectivos hospitais e posterior entrega para a realização dos estudos, logo observamos que não era o método ideal pois os espécimens eram preparados ou acondicionados inadequadamente ou entregues muito tempo após serem retirados das peças cirúrgicas e não se prestavam mais para análise. Logo concluímos que o material deveria ser coletado diretamente pelos pesquisadores. Essas dificuldades implicaram em um grande gasto de tempo e refletem a falta de integração e funcionalidade entre as áreas da prática e da pesquisa no nosso meio, em detrimento de ambas.

Embora do ponto de vista de informação genética possa parecer menos interessante, optamos por incluir no estudo tumores esporádicos uma vez que são os mais comuns na prática. Muitos esforços estão sendo feitos pela comunidade científica, no sentido de se caracterizar melhor esses tumores, uma vez que já se conhece um pouco melhor a carcinogênese colorretal, baseado principalmente em estudos prévios com tumores familiares. Atualmente busca-se um domínio maior também dos casos esporádicos, que são na verdade os mais freqüentes.

Nas 31 amostras coletadas e analisadas houve predomínio de casos esporádicos (90,4% de esporádicos e 9,6% de casos familiares) como é o esperado para amostras colhidas aleatoriamente, pois segundo dados da literatura casos familiares variam de 10% a 20% (Miltenburg et al., 2000; Petersen et al., 1991). Entre os casos com história familiar havia 1 paciente com 45 anos, com relato de 2 outros casos de tumor de cólon na família (caso 0), mas sem preencher completamente os critérios de Amsterdã já citados, portanto até o momento poderia ser caracterizado como FCC embora com forte suspeita de HNPCC.

Dois outros pacientes (caso 21 e 29) possuíam tumor metacrônico, sem história familiar e embora esses tumores sejam mais comuns em pacientes HNPCC, clinicamente não

preenchiam todos os critérios necessários, mesmo assim poderiam, na verdade, serem casos índices (Box et al., 1999).

Dois pacientes (caso 3 e 30) eram irmãos e possuíam uma forma atenuada de polipose familiar, em torno de 100 pólipos adenomatosos em cólon e reto (Lynch e Smyrk, 1998a; O'Sullivan et al., 1998; Lynch e Smyrk, 1998b), um deles já apresentava tumor ao ser operado e toda a família era acometida sugerindo uma doença de padrão autossômico dominante caracterizando a FAP conforme pode ser verificado no heredograma (Fig.7).

Essas considerações tornam-se importantes, visto que, alguns autores como Farrington e cols (1998) citam que uma porcentagem importante de probandos jovens com câncer de cólon (28%) carregam uma mutação germinativa no sistema de reparo de DNA e que estes indivíduos representam pessoas com alto risco de câncer colorretal. Se por um lado temos que a restrição de testes genéticos aos com HNPCC conforme definido pelos critérios de Amsterdã excluem uma fração importante de carreadores desses genes na população em geral, por outro a pesquisa indiscriminada que implica em um enorme trabalho, pode levar a identificação de muito poucos carreadores. A literatura nos diz que quando analisamos pacientes com tumores esporádicos de cólon abaixo de 35 anos encontramos uma frequência de instabilidade de microssatélites de 48% diferentemente de outras séries que não levam em conta a idade e onde a frequência é de apenas 15%. A detecção de instabilidade de microssatélites apresentou uma sensibilidade para mutação no sistema de reparo, nesse estudo de Farrington, de 86% e especificidade de 73%, o valor preditivo positivo e negativo foi de 63 e 90% respectivamente.

Atualmente os pacientes com suspeita de HNPCC, mas sem preencher os critérios de Amsterdã, principalmente aqueles com tumores de cólon direito do tipo mucinoso e que ocorrem abaixo dos 50 anos, com presença de tumores metacrônicos ou sincrônicos, podem ser submetidos a pesquisa de instabilidade de microssatélites como forma inicial de se caracterizar mais precocemente um caso índice de HNPCC e realizar o acompanhamento ou investigação em familiares de risco (Miltenburg et al., 2000; Petersen et al., 1991; Giardello, 1997; Lynch e Smyrk, 1998). Esses pacientes são considerados como tendo um fenótipo mutador quando apresentam uma taxa de instabilidade de cerca de 30% em no mínimo 10 marcadores testados.

Mais recentemente alguns autores têm relatado que o marcador BAT 26 formado por repetições de (A)n tem correspondência de praticamente 100% com a instabilidade

evidenciada com 10 marcadores polimórficos, Hoang e cols (1997) encontraram alteração do BAT 26 em 99,4% de tumores colorretais MIN(+) e Sturzenecker (1998) encontrou que o mesmo marcador estava alterado em todos os 6 tumores que estudou e que tinham pelo menos dois locos de repetição de dinucleotídeos instáveis, esses achados se confirmados em outra séries poderão representar forte arma na avaliação inicial desses pacientes com suspeita de instabilidade. Logo, na nossa amostragem, os pacientes 0, 21 e 29 apresentam suspeita clínica de HNPCC, e a instabilidade de microssatélites representa o melhor método de avaliação inicial na tentativa de se identificar grupos de alto risco para tumores de cólon metacrônicos ou a identificação de outros casos suspeitos na família. Já os pacientes com FAP, como os casos 3 e 30, podem ser, inicialmente, estudados para as mutações no gene APC e posteriormente terem suas mutações bem caracterizadas, o que pode ser de grande utilidade para o acompanhamento dos familiares, mas que extrapolam os objetivos do nosso trabalho (Gebert et al., 1999; Groden et al., 1991; Wu et al., 1998).

Houve uma discreta predominância de casos no sexo feminino (61% vs. 39%) que pode dever-se ao pequeno tamanho da amostra, uma vez que a incidência dos cânceres de cólon é similar em ambos os sexos, além disso em uma das instituições onde foram coletadas amostras o público alvo de atendimento é formado por número maior de mulheres, porém esses dados quando comparados com a média da literatura não apresentam diferença estatisticamente significativa ($p=0,13$). A idade mediana foi em torno de 61,7 anos compatível com a existência de um maior número de tumores esporádicos, mas 6 (20,7%) pacientes apresentavam menos de 50 anos e desses 2 eram portadores de tumor de cólon direito. Os três pacientes com história familiar apresentavam idade abaixo de 50 anos, o que se encontra de acordo com dados de outros autores onde pacientes com uma história familiar tem uma idade mais precoce de ocorrência da doença.

Observamos nas nossas amostras um predomínio, exagerado, em relação à literatura, de tumores no cólon esquerdo 83,7% versus 16,3% no cólon direito, enquanto na literatura temos em nativos da América cerca de 55,8% de tumores à esquerda do angulo esplênico e em brancos americanos cerca de 70,3% de tumores do cólon esquerdo e reto (Cecilia M. Fenóglío-Presser, 1999). Acreditamos que essa diferença deva-se à obtenção de material em serviços especializados e portanto com uma amostragem direcionada para os tumores do cólon E, uma vez que praticamente, pacientes com tumores de cólon D são operados por um número maior de profissionais, já os do cólon E, principalmente os de reto, são encaminhados

para serviços especializados, seja por dificuldades técnicas seja pela sintomatologia que leva o paciente a procurar diretamente um especialista.

Entre os 23 tumores localizados à esquerda do ângulo esplênico, 11 (47,8%) eram do reto. Observamos que 53,6% dos tumores foram classificados como em estágio avançado (III e IV), e apenas 10,7% eram do estágio I o que esta de acordo com dados da literatura onde a maioria dos tumores são diagnosticados tardiamente.

Pode ser observado entre as amostras coletadas e analisadas que obtivemos um alto índice de sucesso na obtenção de tecido tumoral em termos de percentagem da amostra. Apenas dois casos não puderam ser considerados e cerca de 70% das amostras continham mais de 80% de tecido tumoral, logo os produtos obtidos desses materiais são considerados úteis para as análises propostas, uma vez que a taxa de tecido tumoral que deve estar presente na amostra deve estar acima de 60% (Lanza et al., 1998; Cohn et al., 1997). Em alguns tumores o número de células tumorais em relação ao total de material da lâmina foi de 40% mas o restante do material não era formado por células e sim de tecido desmoplásico e quando considerávamos apenas o conteúdo celular houve predomínio absoluto de material tumoral. Em 2 casos (casos 4 e 31) havia pequena quantidade de material tumoral e as amostras foram desprezadas. Logo o método utilizado se mostrou adequado para o estudo proposto, pois em 31 amostras 29 estavam adequadas.

A metodologia usada para obtenção do DNA foi baseada na extração por fenol clorofórmio (item 3.5 material e métodos) e mostrou-se eficaz. Em 31 casos foram obtidas 30 extrações com sucesso em um pequeno fragmento de 1cm³. Esses dados nos permitem considerar que a análise e a coleta de DNA de material tumoral proveniente do cólon não afeta os posteriores estudos das peças cirúrgicas do ponto de vista de anatomopatológico e estadiamento de tumor, o que muitas vezes não é possível em tumores muito pequenos como alguns de mama e de tireóide por exemplo.

Como já citado (Hood et al., 1990; Takanishi et al., 1996; Tomoda et al., 1993; Suzuki et al., 1998) a avaliação da ploidia é realizada na grande maioria dos casos pelo método de citometria de fluxo que permite a contagem de um número muito grande de células (10.000 a 250.000 células em média) e a interpretação dos resultados através da relação G0/G1, além da análise da curva de frequência de células diplóides e não diplóides, o que expressa bem o que esta acontecendo em relação à taxa de mitose, células em fase "S" e proliferação celular, mas demanda um aparato mais dispendioso e a obtenção de uma suspensão com um grande

número de células para análise. Já a Morfometria Digital Computadorizada (Auer et al., 1980; Castro, 1995; Caliari, 1997) permite uma análise da forma do núcleo bem como de sua intensidade de coloração e indiretamente da medida da ploidia do DNA, mas a contagem é muito demorada e realizada em número menor de células, o que pode implicar em erro de amostragem, além de necessitar de um preparo adequado de tecido ou lâminas com as células a serem contadas. Por outro lado quando se dispõe de pessoa especializada e treinada para a avaliação pode-se separar as células de interesse das demais, o que melhora a representatividade da amostra o que não pode ser feito no FACSCAN. Pode-se, também, realizar a análise de tecido em cortes mas com programa específico, no nosso caso, dispunhamos de programa que obrigatoriamente necessitava que os núcleos das células estivessem bem corados e separados uns dos outros para que a contagem fosse feita, pois núcleos que se tocassem ou estivessem sobrepostos eram contados e analisados como um único.

Nas nossas amostras encontramos 60% de tumores contendo material diplóide conforme a classificação descrita por Auer (1980), inicialmente usada para células de tumores de mama, considerando a mediana dos valores obtidos no tecido normal como sendo $2n$. O mesmo método foi usado para análise das células de cólon, uma vez que baseia-se no tamanho e coloração do núcleo e que é necessário a comparação com o padrão normal do tecido correspondente.

Foi também feita a análise do material através do histograma de pontos que nos permite distribuir as células pelo valor da ploidia, quando comparadas com o padrão normal $2C$, avaliando-se a frequência das mesmas. Esses histogramas nos dão uma excelente visão da distribuição da frequência das células em relação ao padrão.

Como as análises são comparativas era fundamental que as amostras fossem pareadas e submetidas ao mesmo tratamento, bem como que fossem coradas em uma mesma bateria para que a margem de erro fosse reduzida.

Observamos que 59,1% das amostras apresentavam histograma do tipo I, conforme pode ser visto no Gráfico 8, o qual está muito próximo do padrão de distribuição das células do tecido normal em torno da mediana $2C$. Como um parâmetro de controle podemos observar a grande similaridade do padrão do histograma de casos diplóides.

Houve uma similaridade quase completa entre as medianas diplóides e histogramas do tipo I. Em apenas dois casos não houve concordância exata entre o valor da mediana e o tipo

de histograma. O que implica em uma boa correlação entre o padrão de distribuição do histograma tipo I e mediana do tecido normal. Tumores aneuplóides, em geral estiveram mais associados com um histograma do tipo IV que mostraram um padrão de distribuição celular bastante irregular com células variando desde valores inferiores a 2C até 8C. Quando analisamos a ploidia nas amostras do estudo encontramos uma taxa global de aneuploidia de 40,9%. A nossa frequência de tumores aneuplóides foi inferior à relatada na literatura por alguns autores, em torno de 75% (Lanza et al., 1998), principalmente quando levamos em conta que a maioria dos casos eram de tumores de cólon Esquerdo, os quais estão mais associados com aneuploidia, porém alguns outros autores, também obtiveram uma frequência menor. Wolley e cols (1982), por exemplo, que foi quem primeiro relatou a distribuição do DNA no tumor de cólon e sua relação com o comportamento clínico, em 33 amostras frescas de tumor, encontrou uma predominância de células diplóides em 20 tumores e predomínio de células aneuplóides em 13 amostras, também Scott e cols (1987) na Mayo Clinic encontrou uma pequena proporção de tumores (13%) com marcada ou acentuada heterogeneidade do DNA. Tomoda et al., (1993) encontrou em 100 amostras de diferentes tumores 41% diplóides e 59% aneuplóides.

Acreditamos que essas diferenças entre diversos trabalhos possam se dever à metodologias diferentes, a diferenças no tamanho do estudo, na seleção de pacientes, nas amostras do tumor, nos métodos de desagregação tecidual, no uso de material fresco ou congelado e à forma de análise.

Já entre os casos aneuplóides temos uma frequência de 33,3% nos tumores do cólon direito e 47,4% nos tumores localizados à esquerda do ângulo esplênico (cólon esquerdo e reto), predominância também verificada na literatura. Quando analisamos os tumores de reto separadamente encontramos 40% de tumores aneuplóides. Na presente análise foram utilizadas somente amostras frescas, com um período máximo entre a coleta e o preparo das lâminas de 4 horas, pois após esse tempo observamos que havia uma grande destruição celular e deformidade das mesmas, prejudicando a análise.

O valor prognóstico da ploidia do DNA, bem como da forma e intensidade da coloração do núcleo celular ainda não está definido claramente, embora a maioria dos investigadores concordem que a presença de populações de células neoplásicas aneuplóides esteja associada com uma sobrevida reduzida dos pacientes. A ploidia tem sido relacionada com o sítio do tumor, bem como, com o tipo histológico e grau de diferenciação, mas não tem

sido evidenciada relação com idade, sexo, estágio e envolvimento linfonodal (Foster et al., 1998; Lanza et al., 1998; Takanishi et al., 1996; Suzuki et al., 1998), embora alguns outros autores não confirmem esses dados (Cohn et al., 1997; Tonouchi et al., 1998; Melamed et al., 1986; Finan et al., 1986; Zarbo et al., 1997). Nas nossas amostras, embora houvesse uma predominância de tumores aneuplóides no cólon esquerdo, essa diferença não alcançou significado estatístico, o que pode ser devido ao pequeno tamanho da amostra, mas foi possível observar uma associação entre valores maiores da ploidia com estádios mais iniciais e valores menores com estádios mais avançados, o que explicamos pelo fato de que, tumores em estádios mais iniciais poderiam apresentar alterações celulares ao nível do DNA que ainda permitissem que células com ploidia alterada, que representam grandes eventos ao nível nuclear, ainda fossem viáveis; já aquelas células de tumores muito avançados e com alterações muito grosseiras ao nível gênico, e da ploidia atingiriam um estágio tal de alterações que a tornassem inviáveis permanecendo aquelas com menores índices de alterações nas células. É importante ressaltar aqui que os achados em relação ao prognóstico ou agressividade do tumor, possivelmente associados com os tumores aneuplóides não são secundários à coincidência entre estado aneuplóide e estágio avançado, já que, a maioria dos autores não observaram essa, e nas nossas amostras observamos exatamente o contrário, ou seja, associação entre estágio mais inicial e aneuploidia, o que pode sugerir que esse dado seja uma fator prognóstico independente do estágio avançado. Wolley et al. (1982) em seu estudo observou que 12 dos 13 pacientes com DNA predominantemente aneuplóide morreram em um período de 3 a 5 anos e 1 paciente que permanecia vivo apresentava doença metastática avançada; já entre os pacientes com tumores diplóides 6 em 20 evoluíram para o óbito no mesmo período e os outros 14 estavam vivos e sem evidência de doença. Quirke e cols. (1987) encontrou uma taxa de sobrevida em pacientes com DNA aneuplóide de 35% comparado com 57% com os diplóides. Além disso Lanza e cols. (1998) e Tomoda e cols (1993) relataram um maior período livre de doença e uma melhor sobrevida para pacientes com tumores diplóides. Nas nossas amostras não foi possível relacionar essas alterações com a sobrevida pelo pequeno tempo de seguimento dos pacientes até o momento.

Lanza et al. também encontraram em um estudo com 191 pacientes uma frequência total de aneuploidia de 75,4% e, concluíram que, o estado da ploidia é um fator prognóstico independente e significativo para pacientes com câncer de cólon, principalmente, aqueles em estágio II da doença. Além disso, verificaram que tumores do cólon direito e proximais à

flexura esplênica eram mais freqüentemente diplóides do que aqueles localizados à esquerda (42,9% vs. 10,3%), e que para esses tumores a ploidia foi um fator prognóstico independentemente significativo para recorrência e sobrevida, o que foi confirmado por Takanishi (1996) e Tomoda (1998). Em tumores com material diplóide há um maior período livre de doença, bem como, uma maior sobrevida naqueles com DNA aneuplóide, e o risco de recorrência e morte relacionado com o câncer foi 3 vezes maior que nos pacientes com tumor diplóide, mesmo depois de se fazer os ajustes para o estadiamento TNM. Também Kouri e cols (1990) e Rognum e cols (1991) mostraram que o estado diplóide permitia discriminar pacientes com diferentes riscos de recorrência e morte relacionada ao câncer nos estádios B e C de Dukes.

Outros autores associam aumento do tamanho do núcleo e variação na sua forma e coloração com piora do prognóstico (Ikeguchi et al., 1999; Changchien et al., 1999). Autores como Melamed (1986), Finan (1986), Zarbo (1997) não encontraram associação entre ploidia e sobrevida.

As aneuploidias do intestino grosso se caracterizam por populações de células próximas de triplóides ou hipotetraplóides, mais freqüentemente. Tumores com aumento moderado de DNA são uma pequena porcentagem e tumores moderadamente aneuplóides ou tetraplóides tem um comportamento clínico mais favorável quando comparados com os outros. Nos nossos casos as aneuploidias foram do tipo hiperdiplóide e tetraplóide. Os três casos de tumores bem diferenciados estavam associados com hiperploidia. Estudos citogenéticos indicam que aneuploidia reflete a presença de populações de células com anormalidades cromossômicas numéricas ou grandes eventos mutacionais, mas os precisos mecanismos que levam a essa aneuploidia não são bem conhecidos (Tolenaar et al., 1997).

A despeito das controvérsias em relação ao valor da ploidia e quantidade de células em fase "S", Suzuki (1998) e Goh e cols (1987) sugerem que, embora esses fatores demonstrem uma contribuição pequena, na avaliação da sobrevida, quando analisados isoladamente, em combinação com outros parâmetros tradicionais podem contribuir para categorizar grupos com comportamento clínicos diferentes.

Nas amostras analisadas houve uma alteração de c-myc em 53,8%, sendo amplificado em 7,6%, e com um valor abaixo do esperado em 46,1%, estando normal em 46,2%. Os valores acima do esperado podem implicar na presença de amplificação e, os valores abaixo do esperado poderiam ser devidos a deleções cromossômicas incluindo o c-myc. Também não

podemos descartar a ocorrência de falsos positivos que poderiam ocorrer por exemplo, devido à hibridização inespecífica de c-myc, ou em alguns casos, falsos negativos devido a não exposição adequada das áreas de interesse pela desnaturação inadequada do DNA, e ocorrendo um valor abaixo do considerado para a faixa de referência ou mesmo não evidenciando uma possível amplificação.

Os oncogenes, nos tumores podem estar ativados e portanto com uma expressão aumentada por uma mutação de ponto ou por rearranjo cromossômico e nesses casos não poderiam ser detectados pela metodologia proposta. Poderia também ocorrer uma amplificação gênica, então poderíamos detectá-la pela intensidade da reação de hibridização. Embora a amplificação tenha sido relatada em alguns tumores colorretais, poucos casos de amplificação gênica específica têm sido relatada e entre elas o c-myc, mas até o momento as evidências não suportam um papel mais importante para a amplificação ou rearranjo de oncogenes na gênese de tumores colorretais.

Diferenças consistentes na expressão ou atividade de outros genes ou produtos de genes têm sido notados em tumores colorretais por exemplo o c-myc é expressado em altos níveis na maioria dos tumores colorretais especialmente aqueles do cólon esquerdo. O significado do aumento ou diminuição da atividade de algum produto gênico é entretanto difícil de ser estudado quando o gene que está codificando o produto não está alterado por mutação. Além disso sabe-se que muitos genes associados com a proliferação celular são expressados em níveis altos no câncer colorretal em relação à mucosa normal, porém outros estudos são necessários para determinar se as diferenças na expressão ou na atividade de c-myc e outros produtos gênicos são um resultado ou causa do estado neoplásico (Vogelstein et al., 1990).

Bufill (1990) cita que a expressão de c-myc pode definir grupos distintos de câncer colorretal, além disso relata que Rothberg e cols. encontraram uma expressão de c-myc mais freqüentemente elevada em tumores do cólon esquerdo que nos do cólon direito. Esses autores acreditam que c-myc alterado estaria mais associado com tumores colorretais que se comportam de forma semelhante aos tumores associados à polipose, além disso, sugerem que a desregulação de c-myc pode resultar em um defeito em um outro gene que regula a transcrição de c-myc. Nas nossas amostras encontramos uma correlação positiva de Pearson ($r = 0,40$) entre valores de c-myc e da ploidia, o que se deve ao fato de que, essas alterações podem refletir processos semelhantes de aumento do material nuclear elevando os valores

da ploidia nos quais pode estar embutido uma possível amplificação de c-myc. Não se sabe a correspondência exata entre o método utilizado e a amplificação de c-myc, uma vez que os resultados podem apresentar falsos positivos como hibridização da sonda a outras regiões parcialmente semelhantes do genoma ou mesmo a não hibridização devido a não exposição adequada das áreas de ligação por desnaturação inadequada do DNA.

Nos nossos casos encontramos uma maior freqüência de alteração de c-myc nos tumores do cólon esquerdo 65,2% versus 40% no cólon direito, mas esses valores não alcançaram significado estatístico, o que pode ser devido ao tamanho da amostra. Além disso os dois casos onde ocorreu a amplificação foram do cólon esquerdo. Por outro lado, como a metodologia utilizada não identificaria alterações na expressão de c-myc, muitos casos poderiam apresentar uma superexpressão com os conseqüentes efeitos da mesma, e não estar sendo detectado da mesma forma uma amplificação de c-myc, detectado por hibridização, o que não implica necessariamente em uma superexpressão, pois o gene amplificado pode estar inativado por alguma outra mutação ou mesmo pelo fato de que a parte amplificada não ser funcionalmente ativa. Seria importante encontrar a freqüência exata de expressão aumentada do c-myc e, posteriormente, avaliar-se o quanto dessa elevação seria em conseqüência de amplificação, ativação por mutação ou rearranjo.

Para a instabilidade de microssatélites avaliou-se o locus D17S855, relacionado com o gene BRCA1 envolvido na tumorigênese do câncer de mama não tendo sido observada perda de heterozigose na região próxima a esse loco. Em 29 amostras não se observou a ocorrência de novas bandas no tecido tumoral em relação ao normal do mesmo indivíduo, o que nos permite dizer que naquele determinado locus não houve instabilidade. No caso 1 observou-se um padrão diferente na migração das bandas entre o tecido tumoral e o normal. Conforme pode ser observado na figura 14 as duas bandas amplificadas do tecido tumoral do caso 1 migraram mais rapidamente que as duas do tecido normal; evidenciando desta forma a presença de alelos menores. A amplificação e corrida desse material foram repetidas e manteve-se o mesmo resultado. Poderíamos supor que o material coletado seria proveniente, todo ele, de um único clone cuja célula original sofreu uma recombinação desigual nessa região, ficando um alelo menor, e o outro maior. Nesse caso a banda que migrou mais do tecido tumoral seria correspondente ao alelo da primeira banda do tecido normal, que perdeu material, e a banda superior do tecido tumoral corresponderia à banda mais inferior do tecido normal que aumentou e migrou menos.

Seria importante ainda considerarmos a possibilidade de contaminação de material com outras amostras ou mesmo trocas, a confirmação de que as amostras são provenientes do mesmo paciente poderia ser feita através de RAPD ou análise de outros marcadores polimórficos.

Como apenas um marcador foi usado não podemos afastar a possibilidade de uma fenótipo de instabilidade. Farrington e cols. (1998) consideram o fenótipo mutador quando pelo menos 30% dos marcadores apresentam instabilidade. Já Sturzenecker (1998) considera acima de 20% de instabilidade, com uma análise de 10 marcadores polimórficos. O fenômeno da instabilidade foi inicialmente descrito e associado a certas famílias portadoras de HNPCC porém recentemente alguns estudos sugerem que outros mecanismos de instabilidade podem estar envolvidos com esse fenômeno nos tumores esporádicos (Foster et al., 1998; Kim et al., 1994; Moslein et al., 1996). Moslein e cols. relatam que em todos os pacientes com mutação em hMLH1 e hMSH2 havia instabilidade mas o contrário não era observado ou seja nem todos os pacientes com instabilidade apresentavam mutação em genes conhecidos, principalmente nos tumores esporádicos, sugerindo que pode haver um outro mecanismo de instabilidade envolvido com tumores colorretais, além disso eles verificaram que tumores do cólon D e MIN + apresentam comportamento muito semelhante àqueles de famílias com HNPCC.

A instabilidade de microssatélites que ocorre em 44 a 49% dos HNPCC e em 14% a 27% dos cânceres de cólon na população em geral, estão mais frequentemente associados com tumores à direita do ângulo esplênico, 70% dos tumores com instabilidade estão à direita do ângulo esplênico. Está também mais frequentemente associado a tumores pouco diferenciados que ocorre em 44% nos HNPCC 14% CCR e com melhor sobrevida. Maniamparmpil e cols. (1999) relatam maior associação dos tumores pouco diferenciados com reação crohn's like, linfonodo (+) e mutação em hMSH2.

Nos nossos casos não podemos dizer quais pacientes são MIN(+) pois só foi testado 1 marcador polimórfico nos pacientes, mas segundo Foster (1998) tumores com p53 negativo, diplóides e no cólon D são associados frequentemente com MIN(+) e portanto o caso 1 e o caso 18, embora não saibamos sua ploidia, tem grande chance de quando testados para mais microssatélites serem MIN(+). Além disso pacientes com idade abaixo de 50 anos ou que tiverem tumor sincrônico, têm maior risco de serem HNPCC e devem ser investigados, pois

os tumores metacrônicos ocorrem na literatura em 18,1 a 58% e nos esporádicos em 2%. Box (1999) encontrou 7,5% de sincrônico e 21,5% de metacrônico em pacientes HNPCC.

Foster (1998) relata uma forte associação entre MIN(+) estado diplóide de DNA sendo que encontrou 43% dos tumores MIN(+) tinham ploidia normal e somente 15% dos MIN(-) eram diplóides, além disso todos os tumores p53(+) eram MIN(-) e nos 7 tumores MIN(+) p53 não foi detectado podendo refletir o fenômeno de que pacientes com MIN(+) não apenas têm uma instabilidade de pares de bases mas de todo o genoma podendo ter havido deleção de p53. Já nos pacientes com p53(+) e MIN(-) pode ter havido uma mutação mas não perda cromossômica.

Nas amostras analisadas houve uma associação entre aneuploidia e tumor de cólon E além disso houve uma associação entre amplificação de c-myc com tumores aneuplóides e com tumor de reto. Não podemos relatar a instabilidade de microssatélites uma vez que como já foi dito apenas um marcador foi testado. Mas o paciente do caso "0" com tumor de cólon D, com idade abaixo de 45 anos, com conteúdo diplóide de DNA e valor de c-myc de 0,62, embora com p53 positivo, muito provavelmente possui a forma não polipóide de câncer de colon. Os casos 21 e 29 como já citados são também fortes suspeitos. Os casos 3 e 30 que são da mesma família mostram taxa de amplificação de c-myc muito próximas podendo representar tumores com características semelhantes mas testes mais aprofundados seriam necessários para caracterizá-los melhor.

A imuno-histoquímica para p53 foi um outro fator analisado. Com o objetivo de se avaliar a ocorrência de mutações em p53, uma vez que a maioria delas geram uma proteína estável que acumula-se no núcleo da célula e pode ser detectada por imuno-histoquímica. Baas e cols. (1994) utilizando 6 tipos de anticorpos monoclonais disponíveis comercialmente obtiveram os melhores resultados com o D07 pois em 7 casos com alta expressão de p53 foi possível detectar a mutação em 6 casos e dos 7 casos sem expressão 6 não tinham mutação. Nos pacientes com baixa expressão haviam 3 tumores sem mutação e dois com mutação. Nesse estudo os autores obtiveram então uma sensibilidade para mutação de p53 de 67%, especificidade de 90%, valor preditivo positivo de 86%, valor preditivo negativo de 75% e uma eficiência de 79%. Kim et al., (1994) relatam 80% de acurácia utilizando o D07.

Imuno-histoquímica positiva está associada com mutação no gene p53, mas podem ocorrer falsos positivos e falsos negativos e esses resultados podem estar associados com o tipo de anticorpo utilizado, disponibilidade biológica dos sítios antigênicos ou epitopos, mas

também a outros fenômenos biológicos. Existem outras mutações além das mutações de ponto tipo "missense" que podem levar à superexpressão de p53, por exemplo alterações na região promotora, havendo superexpressão e acúmulo de p53 tem sido sugerido em uma família com câncer de mama (Baas et al., 1994). Outros genes ou proteínas podem interagir com a proteína selvagem de p53 estabilizando-a. Células sob insultos genotóxicos podem apresentar aumento de p53, pois sabe-se que esta proteína é importante tanto no mecanismo de reparo ou de apoptose que podem ser desencadeados por estes danos.

Um resultado falso negativo pode ocorrer pela geração de um "stop codon", truncando a proteína e tornando seu acúmulo e superexpressão impossível ou a proteína mutada pode não conter o domínio de ligação do anticorpo utilizado. Além disso a mutação pode ser uma deleção grosseira que abole todo o produto protéico de p53, outra possibilidade é que a mutação em questão tipo "missense" não leve à estabilização da proteína e sua conseqüente acumulação. Áreas focais positivas podem resultar de pequenos clones com mutação, essas amostras fracamente positivas são consideradas pela maioria dos autores como sendo negativas (Baas et al., 1994; Kim et al., 1994). Portanto mesmo com essas limitações a imuno histoquímica para p53 tem sido utilizada como um método mais fácil para a detecção de mutação em p53 uma vez que outros métodos disponíveis para esses estudos implicam em maiores gastos financeiros e de tempo, e o p53 conforme já citado tem sido utilizado para ajudar a classificar grupos com comportamentos clínicos distintos.

Nas nossas amostras obtivemos, utilizando o anticorpo D07, 50% de positividade e 45,5% de negatividade e 4,5% fracamente positivo, e embora não tenha atingido um valor estatisticamente significativo houve uma maior proporção de p53 positivo nos tumores em estágio mais inicial e entre aqueles à esquerda do ângulo esplênico, foi mais comum nos tumores do cólon esquerdo que no reto. Independente disso estudos têm mostrado uma associação entre tumores diplóides, pouco diferenciados, com MIN+ e p53 negativo como tendo um melhor prognóstico. Essa discrepância entre achados histológicos de tumor pouco diferenciado com melhor prognóstico pode estar relacionado com resposta peritumoral do hospedeiro mais intensa, talvez as numerosas mutações que ocorram nos tumores RER+ afetem não somente genes que controlam o crescimento celular mas também aqueles que influenciam a expressão de antígenos associados ao tumor e que levam a uma resposta imune do hospedeiro. Como há uma forte associação entre tumores p53 - e RER + podemos extrapolar que afastados os outros fatores, a negatividade de p53 possa representar um dado

que sugira um melhor prognóstico, que no futuro, uma vez confirmado por estudos adicionais possa ser usado como um fator prognóstico na clínica (Kim et al., 1994).

Alguns trabalhos mostram deleções alélicas de 17p e 18q e mutações no p53 como mais freqüentes em tumores com DNA aneuplóide que diplóide o que também pode representar grandes perdas e/ou duplicação de outras regiões havendo associação entre p53 e aneuploidia ou p53 e mutação com acúmulo de p53 (Cohn et al., 1997; Vogelstein et al., 1988; Vogelstein et al., 1992; Peinado et al., 1992).

Alguns autores sugerem que a ploidia do DNA pelo menos em parte parece refletir vias genéticas distintas de carcinogênese operando no cólon proximal e distal (Delattre et al., 1989). Essas diferenças que podem ser detectadas por exames laboratoriais citogenéticos ou de biologia molecular bem como outras alterações citadas como amplificação de c-myc ou outros oncogenes, mutação em genes supressores de tumor como a detectadas em p53 por imuno histoquímica e outras não analisadas aqui além de defeitos no sistema de reparo dos erros de pareamento do DNA testados por instabilidade de microssatélites podem refletir algumas das diferenças que são notadas nas propriedades biológicas dos segmentos distais e proximais do epitélio colônico normal adulto e fetal, bem como nos aspectos epidemiológicos, patológicos, citogenéticos e achados moleculares no câncer colorretal distal e proximal.

Tumores proximais parecem representar uma forma mais estável da doença e podem crescer através dos mesmos mecanismos subjacentes ao HNPCC. Tumores distais mostram evidências de maior instabilidade genética e pode se desenvolver através dos mesmos mecanismos subjacentes a síndromes poliposas associadas ao câncer colorretal.

A grande questão hoje é que o conhecimento dos mecanismos do tumor de cólon no nível molecular e genético atingiu um ponto tal que se observam tumores que embora ocupem o mesmo estadiamento e aparentemente deveriam ter um comportamento semelhante apresentam comportamento biológico completamente diferente e é com a intenção de classificar melhor esses tumores que se tem trabalhado na busca de marcadores e alterações bioquímicas e moleculares que expliquem caminhos diferentes de tumorigênese para diferentes tumores.

6 CONCLUSÕES

- 1 Houve uma maior proporção (65,5%) de casos do sexo feminino nas amostras analisadas, mas sem significado estatístico. A idade média foi de 61,7 anos, 90,7% dos casos eram de tumores esporádicos e 9,3% de tumores com características familiares, 82,1% eram das amostras eram de tumores de cólon esquerdo e desses 47,8% eram de reto, 53,6% dos tumores analisados eram de estágio III ou IV. Confirmando a tendência para diagnóstico em estágio avançado da doença.
- 2 A coleta de fragmentos de 1cm³ na intimidade do tumor mostrou-se eficaz para a obtenção de material (células e DNA) suficiente para a análise da ploidia, amplificação do c-myc e imuno histoquímica para p53. O método utilizado para obtenção de células, digestão e preparo das lâminas para ploidia mostrou-se eficaz com 95% de sucesso para as amostras estudadas.
- 3 Obtivemos um índice de aneuploidia de 40,9% nas amostras analisadas. Embora tumores diplóides tenham sido mais comuns à direita e entre os da esquerda no reto, essa diferença não alcançou significado estatístico. Não houve relação da ploidia com média de idade, idade maior ou menor que 50 anos, sexo, localização do tumor, grau de diferenciação ou níveis de CEA. Houve uma forte tendência a associação entre valores maiores da ploidia e tumores mais iniciais e entre valores menores da ploidia e tumores mais avançados ($p = 0,07$).
- 4 A imuno histoquímica para p53 foi positiva em 50% das amostras analisadas. Pacientes com câncer em estágio mais inicial foram mais frequentemente associados com p53 positivo e os tumores mais avançados com p53 negativos. Entre os tumores à esquerda do ângulo esplênico os tumores do cólon esquerdo foram mais frequentemente associados com acúmulo de p53 por imuno histoquímica que os do reto, embora esses dados não tenham atingido significado estatístico. Não houve associação entre imuno histoquímica para p53 e sexo, média de idade, idade maior ou menor que 50 anos, localização, estadiamento, grau de diferenciação do tumor.
- 5 Houve amplificação do c-myc em 7,6% das mostras analisadas e em 46% casos pode ter havido deleção de c-myc. Não houve relação das alterações do c-myc com a idade, sexo, localização do tumor estadiamento ou grau de diferenciação e níveis de CEA.

Houve uma tendência a associação entre valores maiores da amplificação do c-myc e pacientes com idade maior que 50 anos.

- 6 Houve uma associação positiva (correlação de Pearson $r = 0,40$) entre valores obtidos para amplificação do c-myc e valor das medianas de ploidia.

Não houve associação entre valores da ploidia normal ou alterada e positividade ou negatividade da imuno-histoquímica para p53.

- 7 Utilizando-se apenas um marcador de microssatélite não foi observada instabilidade.

- 8 Os fatores analisados: c-myc e positividade da imuno-histoquímica para p53 não apresentaram relação com a agressividade do tumor avaliada pelo estadiamento ou grau de diferenciação. A ploidia mostrou associação com o grau de estadiamento do tumor. Os três fatores não apresentaram relação entre si. O que pode indicar que se em outros estudos esses dados apresentarem relação com a sobrevida ou outros indicadores de agressividade, os mesmos poderão ser considerados como fatores independentes na avaliação, podendo ajudar a caracterizar grupos distintos.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Mecklin, J-P., P., Leach, F.S., Sistonen, P., Mecklin, J-P., Jarvinen, H., Jass, R. J., Green, J. S., Lynch, H. T., Watson, P., Tallqvist, G., Juhola, M., Sistonen, P., Hamilton, S. R., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Chapelle, A. (1994). **Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res.* 54:1645-1648**

Aaltonen, L.A., Peltomaki, P., Leach, F.S., Sistonen, P., Pylkkanen, L., Mecklin, J-P., Jarvinen, H., Powell, S. M., Jen, J., Hamilton, S. R., Petersen, G. M., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., Chapelle, A. (1993). **Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 260:812-815**

Aebi, S., Kurdi-Haidar, B., Gordon R., Cenni, B., Zheng, H., Fink, D., Christen, R. D., Boland, C. R., Koi, M., Fishel, R., Howell, S. B. (1996). **Loss of DNA Mismatch Repair in Acquired Resistance to Cisplatin. *Cancer Research.* 56:3087-3090**

Alitalo, K., Bishop, M., Smith, D.H., Chen, E.Y., Colby, W.W. (1983). **Levinson AD. Nucleotide sequence of the v-myc oncogene of avian retrovirus MC29. *Proc. Natl. Acad Sci USA.* 80(1):100-104**

Alves, V.A.F., Bacchi, C.E. e Vassallo, J. (1999). ***Manual de Imunohistoquímica*, ed. Sociedade Brasileira de Patologia .São Paulo.**

Auer, G.U., Caspers, B.O., Wallgren, A.S. (1980). **DNA content and survival in mammary carcinoma. *Anal Quant Cyt* 2:161-165**

Baas, I.O., Mulder, J.W.R., Offerhaus, J.A., Vogelstein, B., Hamilton, S.R. (1994). **An Evaluation Of Six Antibodies For Immunohistochemistry of Mutant p53 Gene Product In Archival Colorectal Neoplasms. *Journal of Pathology.* 72: 5-12**

Berns, E.M.J.J., Klijn, J.G.M., van Putten W.L.J., van Staveren, I., Portengen, H. Foekens J. A. (1992). **c-myc Amplification Is a Better Prognostic Factor than HER2/neu Amplification in Primary Breast Cancer. *Cancer Research.* 52:1107-1113**

Bonolla, M., Ramirez, M., Lopez-Cueto, J., Gariglio, P. (1988). **In Vivo Amplification and Rearrangement of c-myc Oncogene in Human Breast Tumors. *J Nat Cancer Inst.* 80(9):666-670**

Box, J.C., Rodriguez- Bigas, M.A., Weber, T. K., Petrelli, N. J. (1999). **Clinical Implications of Multiple Colorectal Carcinomas in Hereditary Nompoliposis Colorectal Carcinoma.** *Dis Colon Rectum.* 42(6):717-721

Bufill, J.A. (1990). **Colorectal Cancer : Evidence for Distinct Genetic Categories Based on Proximal or distal Tumor Location.** *Ann Intern Med.* 113:779-789

Caliari, M. V.(1997). *Princípios de Morfometria Digital. KS 300 para Iniciantes.* 1^a. ed. Ed. UFMG. Belo Horizonte.

Carethers, J. M. (1996). **Patogênese Celular e Molecular do Câncer Colorretal; Neoplasia corretal I : Bases Científicas Para o Tratamento Atual.** *Clín. Gastroenterol. Am. Norte.* 4:741-57

Castro M.C.L. (1995) **Ploidia de DNA e amplificação de oncogenes em tumores primários de mama humana e respectivas metástases axilares.** Tese apresentada para obtenção do título de Doutor ao Instituto de Biociências, USP, São Paulo.

Cecilia M. Fenoglio- Presser. (1999). *Gastrointestinal Pathology Plus: An Atlas and text* Lippincott Raven. Filadélfia

Changchien, C. R., Wang, J. Y., Tang, R. and Ho, Y-S. (1997). **Pathogenetic Implications of DNA Nondiploidy in colorectal Cancer.** *Dis Colon Rectum.* 40(10):1244-1247.

Cohn, K.H., Ornstein, D., Wang, F., LaPaix, F. DeSoto, Phipps, K., Edelsberg , C., Zuna, R., Mott L. A., Dunn, J. L.(1997). **The Significance of Allelic Deletions and Aneuploidy in Colorectal Carcinoma - results of a 5-Year Follow-Up Study.** *Cancer.* 79(2):233-43

Cooper, D.L., Lahue, R.S., Modrich, P. (1993). **Methyl-directed mismatch repair is bidirecional.** *J Biol Chem.* 268:11823

Datta, A., Adjiri, A., New, L., et al: (1996). **Mitotic crossovers between diverged sequences are regulated by mismatch repair proteins in *Saccharomyces cerevisiae*.** *Molec Cell biol.* 16:1085

Delattre O, Olschwang S, Law DJ, Melot T, Remvikos Y, Salmon RJ, et al. (1989). **Multiple genetic alterations in distal and proximal colorectal cancer.** *Lancet* 88:353-6.

Dib, C., Fauré, S., Fizames, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A., Millasseau, P., Marc, S., Hazan, J., Seboun, E., Lathrop, M., Gyapay, G., Morissette, J., Weissenbach, J. (1996). A

comprehensive genetic map of the human genome based on 5,264 microsatellites. *Nature*. 380:152-154

Drumond, J.T., Li, G-M., Longley, M.J., et al: (1995). Isolation of a hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*. 268:1909

Farrington, S.M., Lin-Goerke, J., Ling, J., Wang, Y., Burczak, J.D., Robbins, D.J., Dunlop, M.G. (1998). Systematic Analysis of hMSH2 and hMLH1 in Young Colon Cancer patients and Controls. *Am. J. Hum. Genet.* 63:749-759

Finan, P.J., Quirke, P., Dixon, M.F., Dyson, J.E.D., Giles, G.R. and Bird, C. (1986). Is DNA aneuploidy a good prognostic indicator in patients with advanced colorectal cancer? *Br J Cancer*. 54:327-330

Foster, S., Sattler, H.P., Hack, M., Romanakis, K., Rohde, V., Seitz G., Wullich, B. (1998). Microsatellite instability in sporadic carcinomas of the proximal colon: Association with diploid DNA content, negative protein expression of p53, and distinct histomorphologic features. *Surgery*. 123(1):13-18

Fuzikawa, A K. (1996) Estudo de alterações genômicas em tumores colorretais em uma população humana. Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre ao Departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte.

Gebert, J.F., Dupon, C., Kadmon, M., Hahn, M., Herfarth, C., Doeberitz, M. K., Schackert, H. K. (1999). Combined Molecular and Clinical Approaches for the Identification of Families with Familial Adenomatous Polyposis Coli. *Ann. Surg.* 2

Giardello, F.M. (1997). Genetic testing in hereditary colorectal cancer. *JAMA*. 278:1278-1281

Goh, H.S., Jass, J.R., Atkin, W.S., Cuzick, J., Northover, J.M.A. (1987). Value of flow cytometric determination of ploidy as guide to prognosis in operable rectal cancer: a multivariate analysis. *Int J Colorect Dis*. 2:17-21

Gordon, H.P. (1999). Malignant Neoplasms of the colon. In: *Principles and practice of surgery for the Colon, Rectum and Anus*. (Gordon, P.H., Nivatvongs, S. 2nd Ed). edn. QMP, pp.575-807

- Groden, J., Thliverias, A., Samowitz, W., Carison, M., Gelbert, L., Albertsen, H., Joslyn, G., Stevens, J., Spirio, L., Robertson, M., Sargeant, L., Krapcho, K., Wolff, E., Burt, R., Hughes, J. P., Warrington, J., McPherson, J., Wasmuth, J., Le Paslier, D., Abderrahim, H., Cohen, D., Leppert, M., White, R. (1991). **Identification and Characterization of the Familial Adenomatous polyposis Coli Gene.** *Cell.* 66:589-600
- Hood, D.L., Petras, R.E., Edinger, M., Fazio, V., Tubbs, R.R.(1990). **Deoxyribonucleic acid ploidy and cell cycle analysis of colorectal carcinoma by flow cytometry. A prospective study of 137 cases using fresh whole cell suspensions.** *Am J Clin Pathol.* 93(5):615-620.
- Ikeguchi, M., Oka, S., Saito, H., Kondo, Tsujitani, S., Maeta, M., Kaibara, N. (1999). **Computerized Nuclear Morphometry - A New Morphologic Assessment for Advanced Gastric Adenocarcinoma.** *Annals of Surgery.* 229(1):55-61
- Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J. (1990). *PCR protocols. A Guide to Methods and Applications.* Academic Press. San Diego, California.
- Ionov, Y., Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Shibata, D., Perucho M.(1993). **Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis.** *Nature.* 363:558-561
- Kastan, M.B., Onuekwere, O., Sidransky, D., Vogelstein, B., Craig, R.W. (1991). *Cancer Res.* 51:6304-6311
- Kim, H., Jen, J., Vogelstein, B., Hamilton, S.R. (1994). **Clinical and Pathological Characteristics of Sporadic Colorectal Carcinomas With DNA Replication Errors in Microsatellite sequences.** *Am. J Pathol.* 145(1):148-156
- Knudson, A.G. (1985). **Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes.** *Cancer Res.* 45:1437-1443
- Kouri, M., Pyrhonen, S., Mecklin J-P, Jarvinen, H., Laasonen A., Franssila K. (1990). **The Prognostic value of DNA Ploidy in Colorectal carcinoma: a prospective study.** *Br J Cancer.* 62:976-981
- Kyzer, S., Mitmaker, B., Gordon, P.H. (1992). **Proliferative activity of colonic mucosa at different distances from primary adenocarcinomas as determined by the presence of statin: A nom proliferation-specific nuclear protein.** *Dis Colon Rectum.* 35:879-883

- Lahue, R.S., Au, K.G., Modrich, P. (1989). DNA mismatch correction in a defined system. *Science*. 245:160,
- Lairmore, T.C., Norton, J.A. (1997). Advances in molecular genetics. *Am. J Surg.* 173:37-41
- Laken, S.J., Petersen, G.H., Gruber, S.B. et al. (1997) Familial colorectal cancer in Ashkenazin due to a hypermutable trait in APC. *Nat Genet* .17:79-83
- Lane, D.P. P53, guardian of the genome. (1992). *Nature*. 358(6381):15-16.
- Lanza, G., Gafà, R., Santini, A., Maestri, I., Dubini, ^a, Gilli, G., Cavazzini, L. (1998). Prognostic Significance of DNA Ploidy in Patients with Stage II and Stage III colon Carcinoma- A Prospective Flow Cytometric Study. *Cancer*. 82(1):49-59
- Li, J., Yen, C., Liaw, D., Podsypanina, K., Bose, S., Wang, S.I., Puc, J., Miliareis, C., Rodgers, L., McCombie, R., Bigner, S.H., Giovanella, B.C., ittmann, M., Tycko, B., Hibshoosh, H., Wigler, M.H., Parsons, R. (1997). PTEN , a Putative Protein Tyrosine Phosphatase Gene Mutated in Human Broin, Breast, and Prostate Cancer . *SCIENCE*. 275:1943-1947
- Lothe, R.A., Peltomaki, P., Meling, G.I., Aaltonen, L.A., Nystrom-Lahti, M., Pylkkanen, L., Heimdal, K., Andersen, T. I., Moller, P., Rognum, T.O., Fossa, S. D., Haldorsen, T., Langmark, F., Brogger, A., de la Chapelle A., Borresen A-L. (1993). Genomic instability in Colorectal cancer: relationship to Clinicopathological Variables and Family History. *Cancer Reseach*. 53:5849-5852
- Luk, G. (1995). *Colonic polyps : Benign and premalignant neoplasms of the colon.: Textbook of Gastroenterology*, 2nd ed. JB Lippincott. Philadelphia.
- Lynch, H.T., Smyrk, T.C. (1998). Classification of Familial Adenomatous Polyposis: A Diagnostic Nightmare. *Am. J. Hum. Genet.* 62:1288-1289
- Lynch, H.T., Smyrk, T.C. (1998). Identifying Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *N Eng J Med.* 338(21):1537-1538
- Maniamparpil S., Smyrk, T., Lin, K. M., Ternent, C. A., Thorson A. G., Blatchford G.J., Christensen, M. A., Lynch, H.T. (1999). Histologic Comparison of Hereditary n

nonpolyposis Colorectal Cancer Associated with MSH2 and MLH1 and Colorectal Cancer from the General Population. *Dis Colon Rectum.* 42(6):722-726

Marra, G., Boland, C.R. (1996). **Reparo do DNA e Câncer colorretal , Neoplasia colorretal I : Bases científicas para o tratamento atual. *Clin. Cirúrg. Am. Norte.* 4:759-775**

Marra, G., Boland, C.R.(1995).**Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst.* 87:1114**

Melamed, M.R., Enker, W.E., Banner, P., Janov, A.J., Kessler, G. and Darzynkiewicz, Z. (1986). **Flow cytometry of colorectal carcinoma with three-year follow-up. *Dis Colon Rectum.* 29:184-186**

Miltenburg, D. M., Conklin, L. and Sastri, S. (2000).**The Role of Genetic Screening and Prophylactic Surgery in Surgical Oncology. *Am Coll Surg.* 190(5): 619- 28**

Miyoshi A. (1997) **Marcadores genéticos em câncer de mama. Monografia apresentada para obtenção do grau de bacharel em Ciências Biológicas aodepartamento de Biologia Geral, UFMG, Belo Horizonte.**

Moslein, G., Tester, D.J., Lindor, N. M., Honchel, R., Cunningham, J. M., French, A. J., Halling, K. C., Schwab, M., Goretzki, P., Thibodeau, S. N.(1996). **Microsatellite instability and mutation analysis of hMSH2 and hMLH1 in Patients with sporadic, familial and hereditary colorectal cancer. *Hum Molec Genet.* 5(9):1245-1252**

Muta, H., Noguchi, M., Perucho, M., Ushio, K., Sugihara, K., Ochiai, A., Nawata, H., Hirohashi, S. (1996). **Clinical Implications of Microsatellite Instability in Colorectal Cancers. *Cancer.*77(2): 265- 270**

Nakamura, T., Tabuchi, Y., Nakae, S., Ohno, M. and Saiton, Y. (1996). **Serum Carcinoembryonic Antigen Levels and proliferating Cell Nuclear Antigen Labeling Index for Patients with Colorectal Carcinoma - Correlation with tumor Progression and survival. *Cancer suppl* 77(8):1741-1746**

Nelen, M.R., Staveren, W.C.G., Peeters, E.A.E., Hassel, M.B., Gorlin, R.J., Hamm, H., Lindboe, C.F., Fryns, J-P., Sijmons, R.H., Woods, D.G., Mariman, E.C.M., Padberg, G.W., Kremer, H. (1997). **Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease. *Human Molecular Genetis.*6(8): 1383-1387**

Nicolaides, N.C., Papadopoulos, N, Liu, B. et al: (1994). **Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*.371:75**

Olschwang, S., Serova-Sinilnikova, O., Lenoir, G.M., Thomas, G. (1998)

PTEN germ-line mutations in juvenile polyposis coli. *Nat Genet.* 18:12-14

O'Sullivan, M. J., McCarthy, T. V., Doyle, C. T. (1998). **Familial Adenomatous Polyposis - From Bedside to Benchside; *Am J Clin Pathol.* 109(3):521-525**

Palombo, F., Gallinari, P., Iaccarino, I. (1995). **GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science*.268:1912**

Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Liu, B., et al: (1995). **Mutations in GTBP in genetically unstable tumors. *Science.* 268:1915**

Papadopoulos, N., Nicolaides, N.C., Wei, Y.F., et al:(1994). **Mutation of a mutL homologin hereditary colon cancer. *Science.* 263:1625**

Park, J.G., Vasen, H.F., Park, K.J., Peltomaki, P., Ponz de Leon, M., Rodriguez-Bigas, M., Lubinski, J., Beck, N.E., Bisgaard, M., Miyaki, M., Wijnen, J.T., Baba, S., Lynch, H.T. (1999). **Suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer : International Collaborative Group of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer criteria and results of genetic disease. *Dis Colon Rectum.* ;42:710-715**

Peinado, M.A., Malkhosyan, S., Velasquez. (1992). **Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89:10065**

Peltomaki, P., Aaltonen, L.A., Sistonen, O. (1993). **Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*.260:810**

Petersen, G. M., Slack, J., Nakamumura, Y.(1991). **Screening Guidelines and Premorbid diagnosis of familial adenomatous polyposis using linkage. *Gastroenterology* 100 : 1658-1664**

Polakis P; (1997). **The Adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor. *Biochimica et Biophysica acta.* 1332: F127-F147**

- Prophet, E.B., Mills, B., Arrington, J. B., Sobin, L. H. (1994). **Laboratory Methods in Histotechnology, American Registry of Pathology, Armed Forces Institute of Pathology, Washington, D.C.**
- Quirke, P., Dixon, M.F., Claydon, A.D., Durdey, P., Dyson, J.D., Williams, N.S. and Bird, C. (1987). **Prognostic significance of DNA aneuploidy and cell proliferation in rectal adenocarcinomas. *J Pathol.*151: 285-291**
- Quirke, P., Dyson, J.E.D., Dixon, M.F., Bird, C.C. and Joslin, C.A.F. (1985). **Heterogeneity of colorectal adenocarcinomas evaluated by flow cytometry and Histopathology. *Br J Cancer.* 51:99-106**
- Reed, K. K. and Mann, D. A.(1985). ***Nuc. Acids Res.* 13.:7207-7221**
- Riggins, G.J., Kinsler, K.W., Vogelstein, B., Thiagalingam, S. (1997). **Frequency of Smad Gene Mutations in Human Cancer. *Cancer Research.* 57(1):2578-2580**
- Rognum, T.O., Lund, E., Meling, G.I., Langmark, F. (1991). **Near diploid large bowel carcinomas have better five year survival than aneuploid ones. *Cancer.*68:1077-1081**
- Rustgi, A.K. (1996). **MAD About Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 111(5):1387-1389**
- Sambrook, J., Fritsch, G.F., Maniatis, T. (1989). ***Molecular Cloning - a Laboratory Manual - 2nd ed.* Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York.**
- Scott, N.A., Grande, J.P., Weiland, L.H., Pemberton, J.H., Beart, R.W. and Lieber, M.M. (1987). **Flow cytometric DNA patterns from colorectal cancers: How reproducible are they? *Mayo Clin Proc.* 62: 331-337.**
- Spirio, L.N., Samowitz, W., Robertson, J., Robertson, M., Burt, R.W., Leppert, M., White, R. (1998). **Alleles of APC modulate the frequency and classes of mutations that lead to colon polyps. *Nature Genetics.*20:385-388**
- Strand, M., Prolla, T.A., Liskay, R.M., et al: (1993). **Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 365:274**
- Sturzeneker R. (1998) **Tumores com deficiência no sistema de reparo de erros de replicação: um modelo para o estudo do processo de mutação de microssatélites. Tese apresentada para obtenção do título de Doutor ao departamento de Bioquímica e Imunologia, UFMG, Belo Horizonte.**

- Suzuki Hiroshi. (1998). **The prognostic value of flow Cytometric DNA Analysis in Colorectal Cancer Patients- Review Article.** *Japanese Journal of Surgery.*18(5):483-486.
- Takanishi, D.M., Hart, J., Covarelli, P., Chappell, R. and Michelassi, F. (1996).**Ploidy as a Prognostic feature in Colonic adenocarcinoma.** *Arch Surg.* 131:587-592.
- Thibodeau, S.N., Bren, G., Schaid, D. (1993). **Microsatellite instability in cancer of the proximal colon.** *Science.* 260:816-819
- Tollenaar R.A.E.M., Bonsing, B.A., Kuipers-Dijkshoorn, N. J., Hermans, J., van de Velde, C.J.H., Cornelisse, C.J. and Fleuren, G. J. (1997). **Evidence of Clonal Divergence in colorectal Carcinoma.** *Cancer.* 79(7):1304-1314
- Tomoda, H., Baba, H., Saito, T. and Wada, S. (1998). **DNA Index as a Significant Predictor of Recurrence in Colorectal Cancer.** *Dis Colon Rectum.* 41(3):286-290
- Tonouchi, H., Matsumoto, K., Kinoshita, T., Itoh, H. and Suzuki, H.(1998). **Prognostic value of DNA Ploidy Patterns of Colorectal adenocarcinoma: Univariate and Multivariate Analysis.** *Dig surg.*15:687-692.
- Vennstrom, B., Sheiness, D., Zabielski, J., Bishop, M.(1982).**Isolation and characterization of c-myc, a cellular homolog of the oncogene (v-myc) of Avian myelocytomatosis virus Strain 29.** *Journal of Virology.* 42(3):773-779
- Vogelstein, B., Fearon, E.R. (1990). **A Genetic Model of Colorectal Tumorigenesis.** *Cell.* 61: 759-767
- Vogelstein, B., Kinsler, K.W. (1992). **p53 function and dysfunction.** *Cell.* 70:523-526
- Vogelstein, B., Fearon, E.R., Hamilton, S.R., Kern, s. E., Preisinger, A. C., Mark Leppert, B.A., Nakamura, Y., White, R., Smits, A. M.M., Bos, J.L.(1988).**Genetic alterations during colorectal tumor development.** *N Engl J Med.* 319:525-532
- Weissenbach, J., Gyapay, G., Dib, C., Vignal, A., Morissette, J., Millasseau, P., Vaysseix, G., Lathrop, M. (1992). **A second-generation linkage map of the human genome.** *Nature.* 359:794-801
- de Wind, N., Dekker, M., Bens, A., et al: (1995). **Inactivation of the mouse Msh2 gene results in mismatch repair deficiency, methylation tolerance, hyperrecombination, and predisposition to cancer.** *Cell.* 82:321

Wolley, R.C., Schreiber, K., Koss, L.G., Karas, M. and Sherman, A. (1982). **DNA distribution in human colon carcinomas and its relationship to clinical behavior.** *JNCI*;69:15-22.

Wu, J. S., Paul, P., McGannon, E. A., Church, J.M. (1998). **APC Genotype, Polyp Number, and Surgical Options in Familial Adenomatous polyposis.** *Ann Surg.*227(1): 57-62

Yeo, C. J. (1999). **Tumor Supressor genes : A short review.** *Surgery.* 125(4): 363-366.

Zarbo, R.J., Nakhleh, R.E., Brown, R. D., Kubus, J. J., Ma, C. K. and Mackowiak, P. (1997). **Prognostic Significance of DNA Ploidy and Proliferation in 309 colorectal Carcinimas as Determined by Two-Color Multiparametric DNA Flow Cytometry.** *Cancer.*79(11):2073-2086

Zhou, S., Kinsler, K.W., Vogelstein, B. (1999). **Going Mad with Smads ;** *N. Engl J. Med.* 341(15): 1144-1146

SAS Institute INC, **SAS User's Guide: Statistics, Version 5 , Cary NC: SAS Institute Inc., 1985New York:**

User manual-Gelexpert Software // Nucleotech - nucleotech corporation -
www.nucleotech.com

INCA [online]. Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Cancer, 2000. Disponível na Internet: - <http://www.inca.org.br>

OMIM - <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/OMIM>

Página de Câncer Colorretal da Sociedade American do Câncer - (ACS homepage)
C:WINDOWS\Desktop\CA colorretal 4.htm

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)