

UNIVERSIDADE DE LISBOA

FACULDADE DE CIÊNCIAS

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



PROGNÓSTICO E RESISTÊNCIA À TERAPÊUTICA NO CANCRO DO COLÓN E RECTO

Zita Sofia da Silva Nunes

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2010

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA VEGETAL



PROGNÓSTICO E RESISTÊNCIA À TERAPÊUTICA NO CANCRO DO COLÓN E RECTO

Dissertação orientada por:

Dra. Cristina Albuquerque, Centro de Investigação de Patobiologia Molecular (IPOLFG EPE)

Prof. Doutora Luisa Cyrne, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Zita Sofia da Silva Nunes

Mestrado em Biologia Molecular Humana

2010

Agradecimentos

Quero agradecer a todos aqueles, que de alguma forma, que me apoiaram e tornaram possível a realização desta tese. Em especial gostaria de agradecer:

À minha orientadora externa Dra. Cristina Albuquerque, pela oportunidade de realizar o meu trabalho no CIPM, pelos conhecimentos científicos que me transmitiu, por todo o apoio, paciência, esforço e dedicação, que permitiu o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao Dr. Bruno Filipe, ao técnico Hélio Belo, à Dra. Inês Francisco, à Dra. Patrícia Silva e a Dra. Célia Baltazar, agradeço todo o apoio, incentivo e carinho que tiveram para comigo e a disponibilidade que sempre demonstraram para me ajudar.

A todos os meus colegas do CIPM que de alguma forma me ajudaram neste trabalho, nomeadamente, Dra. Sofia Fragoso, Dra. Cheila Torre, Doutora Jacinta Serpa, técnica Sidónia Santos, Dra. Patrícia Machado, Dr. Marco Moedas, técnica Susana Moita, técnica Sandra Machado e Dra. Joana Costa.

À coordenadora do mestrado, Doutora Filomena Caeiro, pela sua pronta disponibilidade em ajudar.

À minha orientadora interna, Doutora Luisa Cyrne, pela sua ajuda e apoio nas fases mais difíceis.

Ao Dr. Ricardo Fonseca pela colaboração na leitura das lâminas de imunohistoquímica, agradeço o seu empenho e compreensão.

À técnica Paula Cardoso por me recebido no laboratório de Anatomia Patológica. À técnica Teresa Pereira, pela ajuda na técnica imunohistoquímica, pela disponibilidade sempre demonstrada em todos dos momentos e também por todo o apoio. Ao técnico Mateus Crespo por me ter sempre ajudado. Agradeço aos restantes colegas da anatomia patológica que sempre me apoiaram e incentivaram.

Às minhas amigas Nádia, Patrícia e Paula pelo apoio incondicional e amizade que sempre demonstraram nos momentos mais difíceis.

Quero dedicar este trabalho à minha família, agradecendo especialmente à minha mãe, ao meu pai, ao meu irmão e aos meus avós, por estarem sempre presentes e por nunca deixarem de acreditar em mim. À minha madrinha e afilhada por todo o carinho.

Ao Flávio pela amizade, carinho e por estar sempre presente. Agradeço todo o apoio dado nas alturas mais difíceis e pelas palavras de incentivo que me levaram a nunca desistir.

Obrigado por terem acreditado em mim!

Resumo

Introdução: O cancro do cólon e recto (CCR) tem como origem a perturbação do equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose. A maioria dos CCR resulta de alterações genéticas em vários genes/vias envolvidos nestes processos celulares, algumas das quais têm sido associadas ao prognóstico e à resposta à terapêutica.

Objectivo: Estudar, em diferentes tipos de CCR, a expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8, correlacionar com a presença de alterações genéticas nas vias WNT e RAS/RAF, e avaliar a sua relação com a sobrevivência, de modo a contribuir para a identificação de marcadores preditivos de prognóstico e de resposta à terapêutica.

Material e métodos: Efectuou-se a análise de expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e caspase 8 por imunohistoquímica em 102 amostras de CCR, estratificadas pela presença de instabilidade de microssatélites (MSI). Foi ainda efectuada a análise mutacional do *KRAS* e do gene *CTNNB1* em algumas amostras de CCR não analisadas num estudo anterior. Os resultados da expressão foram correlacionados com as mutações nos genes *APC*, *CTNNB1*, *TCF7L2* e *KRAS* (teste exacto de Fisher) e no final com a sobrevivência dos doentes (teste *log rank*).

Resultados: Verificou-se uma maior expressão de p21, caspase 3 e caspase 8 nos tumores MSI em relação a tumores sem MSI (MSS) ($p=0,005$; $p=0,03$ e $p=0,01$ respectivamente). A relação entre a expressão das caspases 3 e 8 e a MSI parece estar associada, respectivamente, à deficiência de *MSH2* ($p=0,06$) e de *MLH1* ($p=0,04$). No síndrome de Lynch, as mutações nos genes *CTNNB1* e *TCF7L2* associaram-se à baixa expressão de caspase 3 ($p=0,0006$ e $p=0,007$, respectivamente) e mutações no *KRAS* relacionaram-se com a elevada expressão de caspase 8 ($p=0,001$). Em doentes com tumores MSI, não submetidos a terapêutica, as mutações no gene *TCF7L2*, especialmente em conjunto com a elevada expressão de caspase 3, associaram-se a um mau prognóstico ($p=0,01$). Em tumores MSS, a reduzida expressão de p21 e a expressão aumentada de caspase 3 encontraram-se significativamente associadas a um melhor prognóstico em doentes tratados com 5-fluorouracilo ($p=0,009$ e $p=0,02$, respectivamente). **Conclusão:** Este estudo sugere que a expressão de p21 e de caspase 3, assim como as mutações no *TCF7L2*, poderão, dependendo da MSI ou do tratamento com 5-fluorouracilo, ser marcadores preditivos de prognóstico. Será importante estender este estudo a um maior número de doentes de modo a confirmar as associações observadas.

Palavras-chave: Cancro do cólon e recto, prognóstico, terapêutica, diferenciação, apoptose.

Abstract

Introduction: Colorectal cancer (CRC) results from several disturbs in the balance between proliferation, differentiation and apoptosis. The majority of CRC originates from genetic alterations in several genes/pathways involved in these cellular processes, some of which have been associated to prognosis and response to therapy.

Aims: To study, in different types of CRC, the p21, caspase 3 and caspase 8 expression and to correlate both with genetic alterations in WNT and RAS/RAF pathways and with survival, in order to identify predictive markers of prognosis and of therapeutic response.

Material and methods: The expression of APC, p21, caspase 3 and caspase 8 proteins were evaluated by immunohistochemistry in 102 CRC samples, stratified by the microsatellite instability (MSI) status. Mutation analysis of *KRAS* and *CTNNB1* was also performed in a few samples not analyzed in a previous study. The results of the expression analysis were correlated with *APC*, *CTNNB1*, *TCF7L2* and *KRAS* mutations (Fisher's exact test) and with patient survival (log rank test).

Results: The expression of p21, caspase 3, and caspase 8 was higher in MSI than in tumors without MSI (MSS) ($p=0.005$, $p=0.03$ and $p=0.01$, respectively). However, the association of caspase 3 and 8 expression to MSI appears to be related to *MSH2* ($p=0.06$) and to *MLH1* deficiency ($p=0.04$), respectively. In Lynch syndrome, *CTNNB1* and *TCF7L2* mutations correlated with low expression of caspase 3 ($p=0.0006$ and $p=0.007$, respectively), whereas *KRAS* mutations were associated with high caspase 8 expression ($p=0.001$). *TCF7L2* mutations, specially in association with high caspase 3 expression, were associated to worse survival ($p=0.01$) in patients with MSI CRC not treated with 5-Fluorouracil (5-FU). In MSS tumors, the reduced expression of p21 and the high expression of caspase 3 were significantly associated to a better prognosis in patients treated with 5-FU based regimens ($p=0.009$ and $p=0.02$, respectively). **Conclusion:** This study suggests that the expression of p21, caspase 3 and also *TCF7L2* mutations may be predictive markers of prognosis, depending on the MSI status or on the use of 5-FU treatment. It will be important to increase the number of patients in order to confirm the observed associations.

Keywords: Colorectal cancer, prognostic, therapeutics, differentiation, apoptosis.

Abreviaturas

5-FU	5-fluorouracilo
Ac	anticorpo
Ag	antigenio
Apaf-1	<i>apoptosis-activating factor-1</i>
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
ATP	adenosinaTri-fosfato
BAX	<i>Bcl-2 associated X protein</i>
<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
Caspase	<i>cysteinyI aspartate-specific proteases</i>
CCR	cancro do cólon e recto
CIN	instabilidade cromossómica (<i>chromosomal instability</i>)
<i>CTNNB1</i>	<i>catenin (cadherin-associated protein)</i>
DAB	3,3` – <i>diaminobenzine tetrahydrochoride</i>
<i>DCC</i>	<i>deleted in colorectal cancer</i>
ddATP	<i>dideoxyadenosine triphosphate</i>
ddCTP	<i>dideoxycytidine triphosphate</i>
ddGTP	<i>dideoxyguanosine triphosphate</i>
ddNTPs	didisoxirribonucleotídeos
ddTTP	<i>dideoxythymidine. triphosphate</i>
DNA	ácido desoxirribonucleico
dNTPs	5`-trifosfato-2`-desoxirribonucleósidos
DR4	<i>death receptor 4</i>
DR5	<i>death receptor 5</i>
dTMP	<i>Deoxythymidine monophosphate</i>
dUMP	<i>Deoxyuridine monophosphate</i>
ERK	<i>elk-related tyrosine kinase</i>
Fas	<i>TNF receptor superfamily, member 6</i>
FasL	<i>Fas ligand (TNF superfamily, member 6)</i>
FdUMP	<i>fluorodeoxyuridine monophosphate</i>
GC	guaninas e citosinas
GDP	guanosina difosfato
GSK3 β	glicogénio sintase cinase 3 β
GTP	guanosina trifosfato
HNPCC	<i>hereditary nonpolyposis colorectal cancer</i>

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
kDa	<i>kilodalton</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Lef	<i>linfoid enhancer factor</i>
LOH	perda de heterozigotia (<i>loss of heterozygosity</i>)
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
Mg ²⁺	magnésio
MLH1	<i>human MUTL Homologue 1</i> (primeiro gene humano homólogo do MUTL bacteriano)
MMR	<i>mismatch repair</i>
MSH2	<i>human MUTS Homologue 2</i> (segundo gene humano homólogo do MUTS bacteriano)
MSH6	<i>human MUTS Homologue 6</i> (sexto gene humano homólogo do MUTS bacteriano)
MSI	instabilidade de microssatélites (<i>microsatellite instability</i>)
MSI-H	instabilidade de microssatélites alto grau (<i>microsatellite instability-high</i>)
MSS	estabilidade de microssatélites (<i>microsatellite stable</i>)
MYC	<i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
MYH	gene humano homologo do gene mutY de <i>E. coli</i>
p21	<i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1A</i>
p53	proteína 53
PAF	polipose adenomatosa familiar
PAM	polipose associada ao gene <i>MYH</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	simétrico do logaritmo decimal da concentração hidrogeniónica
<i>primer</i>	oligonucleótido iniciador
PT	pre-treatment
RA	recuperação antigénica
RNA	ácido ribonucleico
SL	síndrome de Lynch
SMAD4 ou DPC4	<i>deleted in pancreatic cancer</i>
T	tirosina
TCF	<i>T-cell factor</i>
TCF7L2	<i>transcription factor 7-like 2</i>
TGFβ	<i>transforming growth factor β</i>

TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
TP53	<i>tumor protein p53</i>
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis –inducing ligand</i>
TRAIL-R1 (DR 4)	<i>TRAIL receptor 1/death receptor 4</i>
TRAIL-R2 (DR5)	<i>TRAIL receptor 2/death receptor 5</i>
Tris-EDTA	ácido etilenodiamino-tetra-acético
TS	timidilato sintetase
WNT	homólogo humano da proteína <i>wingless</i> na <i>Drosophila</i>

Índice geral

Abreviaturas	IV
Índice geral	VII
Índice de figuras	VIII
Índice de tabelas	VIII
Índice de gráficos	IX
Índice de anexos	IX
1. Introdução	1
1.1. Cancro do Cólon e Recto	1
1.1.1. Epidemiologia e etiologia	1
1.1.2. Tumorigénese colorectal – alterações morfológicas e moleculares	1
1.1.2.1. Sequência adenoma-carcinoma	1
1.1.2.2. Instabilidade de microssátelites e o síndrome de Lynch	3
1.2. Proliferação, diferenciação e apoptose no CCR	4
1.2.1. Via de tradução de sinal WNT	5
1.2.2. Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK	6
1.2.3. Via do p21	6
1.2.4. Via apoptótica das caspases	7
1.3. Marcadores de prognóstico no CCR	8
1.4. Marcadores preditivos de resposta à terapêutica no CCR	9
2. Objectivos	11
2.1. Objectivo geral	11
2.2. Objectivos específicos	11
3. Material e métodos	12
3.1. Material biológico	12
3.2. Métodos	12
3.2.1. Análise da expressão das proteínas p21, APC, caspase 3 e caspase 8 por imunohistoquímica	12
3.2.2. Análise mutacional dos genes <i>CTNNB1</i> e <i>KRAS</i>	16
3.2.2.1. Amplificação de DNA recorrendo à técnica de PCR	16
3.2.2.2. Controlo da eficiência da reacção de PCR em gele de agarose	17
3.2.2.3. Reacção de sequenciação	17
3.2.2.4. Precipitação e purificação do produto da reacção de sequenciação	17
3.2.2.5. Análise das amostras no sequenciador automático	18
3.3. Análise estatística	18
4. Resultados e discussão	19

4.1. Análise da expressão por imunohistoquímica em tumores com síndrome de Lynch, HNPCC, esporádicos MSI e MSS	19
4.1.1. Expressão de p21	22
4.1.2. Expressão da caspase 3	23
4.1.3. Expressão da caspase 8	24
4.1.4. Associação entre a expressão das proteínas caspase 3, caspase 8 e p21	25
4.2. Relação entre a expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 e as mutações nos genes <i>APC</i> , <i>CTNNB1</i> , <i>TCF7L2</i> e <i>KRAS</i>	25
4.3. Expressão das proteínas p21, caspases 3 e 8 e mutações em genes específicos das vias WNT e RAS/RAF: correlação com a sobrevivência com ou sem terapêutica	27
4.3.1. Tumores MSI	27
4.3.2. Tumores esporádicos MSS	29
5. Conclusão	32
6. Bibliografia	34
7. Anexos	37

Índice de figuras

Figura 1 - Modelo genético de tumorigênese colorectal proposto por Vogelstein – sequência adenoma carcinoma.	2
Figura 2 - Expressão das proteínas p21, APC, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica em tecidos incluídos em parafina para algumas das amostras de CCR analisadas.	20

Índice de tabelas

Tabela 1 - Diluição e condições de incubação utilizadas para cada Ac primário.	13
Tabela 2 - Condições de recuperação antigénica utilizadas para os vários anticorpos.	14
Tabela 3 - Programa de PCR utilizado para amplificação dos exões 2 e 3, respectivamente dos genes <i>KRAS</i> e <i>CTNNB1</i> .	17
Tabela 4 - Expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 nos vários tipos de tumores do cólon e recto estratificados por natureza esporádica ou hereditária e por instabilidade de microssatélites.	23
Tabela 5 - Correlação entre a expressão de caspase 3 e de p21 em tumores de síndrome de Lynch (SL).	25

Tabela 6 – Correlação entre a expressão das proteínas p21, caspase 3 e 8 e as mutações nos genes <i>CTNNB1</i> , <i>TCF7L2</i> e <i>KRAS</i> em tumores de síndrome de Lynch (SL).	26
--	----

Índice de gráficos

Gráfico 1 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre o estado mutacional do gene <i>TCF7L2</i> e a sobrevivência em CCR com MSI na ausência de terapêutica.	28
--	----

Gráfico 2 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre o estado mutacional do gene <i>TCF7L2</i> e a sobrevivência em CCR com MSI na ausência de terapêutica, em doentes sem metástases.	28
---	----

Gráfico 3 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre a expressão de p21 e a sobrevivência em CCR MSS, em doentes submetidos a terapêutica.	30
---	----

Gráfico 4 - Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre a expressão de caspase 3 e a sobrevivência em CCR MSS, em doentes submetidos a terapêutica paliativa.	30
---	----

Índice de anexos

Anexo I – Via de sinalização WNT.	37
-----------------------------------	----

Anexo II – Via de sinalização RAS/RAF.	38
--	----

Anexo III – Activação da via p53-p21 em resposta a lesões no DNA.	39
---	----

Anexo IV – Via apoptótica das caspases.	40
---	----

Anexo V – Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do <i>APC</i> nos tumores de Síndrome de Lynch, HNPCC MSS e MSI, esporádicos MSI e MSS.	41
---	----

Anexo VI – Resultados da análise mutacional dos genes <i>KRAS</i> e <i>CTNNB1</i> .	46
---	----

Anexo VII – Soluções utilizadas.	47
----------------------------------	----

Anexo VIII – Condições utilizadas na reacção de PCR para amplificação do gene <i>KRAS</i> e <i>CTNNB1</i> .	49
---	----

Anexo IX – Correlação entre a expressão imunohistoquímica das proteínas p21, caspase 3 e 8 e as mutações nos genes <i>CTNNB1</i> , <i>TCF7L2</i> e <i>KRAS</i> em tumores esporádicos MSS e MSI, HNPCC MSS e MSI e de síndrome de Lynch.	50
--	----

1. Introdução

1.1. Cancro do Cólon e Recto

1.1.1. Epidemiologia e etiologia

O cancro do cólon e recto (CCR) é uma das neoplasias mais comuns na espécie humana e uma das mais frequentes formas de cancro hereditário. Este representa um importante problema de saúde pública e possui uma distribuição mundial, com uma taxa de incidência mais elevada nos países industrializados como por exemplo América do Norte e Austrália, e uma taxa de incidência mais baixa nos países menos desenvolvidos como a Ásia e África [1]. Em Portugal, a sua incidência tem vindo a aumentar significativamente, constituindo a primeira causa de morte por cancro neste país [2].

O CCR é uma entidade de etiologia multifactorial, sendo amplamente aceite a noção de que na sua origem estão envolvidos factores hereditários assim como ambientais, nomeadamente nutricionais, durante iniciação e progressão tumoral [3]. Um dos factores ambientais implicado como factor de risco para o desenvolvimento do CCR é a alimentação, nomeadamente uma dieta com excesso de calorias, proteínas animais, álcool, lípidos, ou por outro lado uma dieta deficiente em fibras, vitaminas (A, C, D, E), minerais (cálcio) e oligoelementos (selénio) [3-6].

Embora os factores ambientais tenham grande importância no desenvolvimento de CCR, os factores hereditários são também considerados como factores de risco, sendo responsáveis por cerca de 20-30% de todos os CCR. A forma não hereditária é, normalmente, designada por CCR esporádico [7].

Os síndromas hereditários mais frequentes são a polipose adenomatosa familiar (PAF), associada a mutações germinais no gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), a polipose associada ao gene *MYH* (PAM) e o síndrome de Lynch (SL), no qual se encontra implicada a presença de mutações germinais nos genes de reparação de erros no DNA do tipo *mismatch* (mais frequentes nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*), e caracterizam-se pelo desenvolvimento de CCR numa idade jovem (aproximadamente 40 anos), ou seja, duas décadas mais cedo comparando com o CCR esporádico [3-4, 7-9].

1.1.2. Tumorigénese colorectal - alterações morfológicas e moleculares

1.1.2.1. Sequência adenoma-carcinoma

A maioria dos CCR desenvolvem-se a partir de lesões neoplásicas benignas, os pólipos adenomatosos ou adenomas. A progressão de adenoma para carcinoma (tumor maligno) envolve uma série de estádios histológicos bem definidos e pode levar

10-15 anos. O processo biológico pelo qual um adenoma progride para carcinoma foi designado por sequência adenoma-carcinoma e foi proposto originalmente em 1990, por Vogelstein e Fearon, um modelo genético para descrever este processo de tumorigénese, vulgarmente designado por *Vogelgrama* (Figura 1).

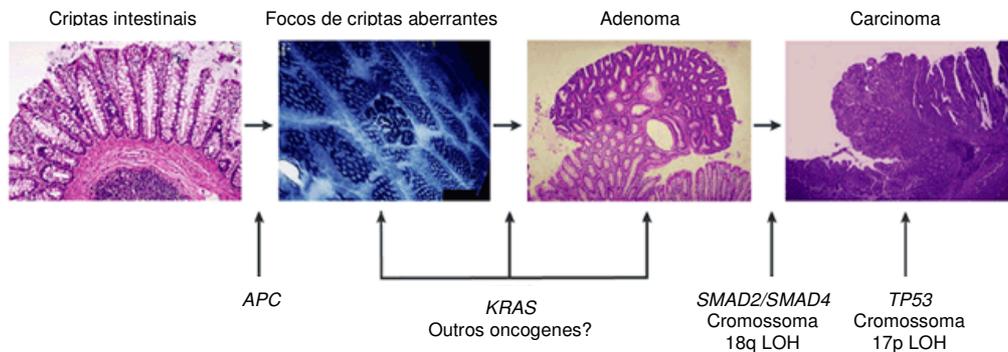


Figura 1 - Modelo genético de tumorigénese colorectal proposto por Vogelstein – sequência adenoma carcinoma (Fonte: adaptado [13]).

Esta sequência indica que a tumorigénese colorectal é um processo biológico que se desenvolve por múltiplas etapas, envolvendo um número variável de alterações histológicas, morfológicas e genéticas específicas que se acumulam ao longo da progressão tumoral [3-7, 10-13].

A formação de um adenoma pré-maligno, que é considerada, na maioria dos casos, a lesão precursora do CCR, é iniciada por eventos mutacionais que ocorrem no gene supressor de tumor *APC*, localizado no cromossoma 5q. A principal função do gene *APC* como supressor de tumor parece residir na capacidade da proteína APC regular negativamente os níveis intracelulares da proteína β -catenina, pela via de sinalização WNT, a qual desempenha um papel importante na regulação do equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose no epitélio cólico [14, 15].

As mutações no oncogene *KRAS* (Kirsten MSV), localizado no braço curto do cromossoma 12 (12p), parecem estar envolvidas na progressão de adenomas iniciais. Estas mutações são bastante frequentes nos CCR e resultam num aumento da actividade GTPase da proteína RAS, envolvida na via de transdução de sinal RAS/RAF/MAPK/ERK, a qual está envolvida no controlo da proliferação celular.

As mutações nos genes supressores de tumor *DCC*, *SMAD4* e *TP53* ocorrem durante fases mais tardias do processo de carcinogénese e resultam na transição de tumores benignos para tumores malignos. O gene *DCC* codifica para uma proteína transmembranar envolvida na adesão celular, enquanto que o *SMAD4* está envolvido na via de transdução de sinal *TGF β /SMAD* que regula o crescimento das células epiteliais do cólon e ambos localizam-se no braço longo do cromossoma 18 (18q) [4, 10, 11, 12]. O gene *TP53*, situado no cromossoma 17p, tem sido designado como o

“guardião do genoma”, pelo facto de ter a capacidade de manter a integridade do DNA. A proteína p53 actua como uma proteína que determina o destino da célula face a erros ocorridos no DNA. Na presença destes, os níveis da proteína p53 aumentam, promovendo a permanência do ciclo celular na fase G1. Esta paragem no ciclo celular facilita a reparação do DNA pelos respectivos sistemas de reparação, antes da sua replicação. Quando o sistema de reparação do DNA falha, ou seja, quando os erros não são reparados ocorre a indução do gene *TP53* levando à apoptose celular (morte celular programada). A perda da actividade supressora tumoral do *TP53* traduz-se numa reduzida capacidade de reparação de eventuais erros no DNA e numa incapacidade de eliminação das células que contém os erros, por apoptose [4,11,12].

Ao longo da sequência adenoma-carcinoma e associado às alterações moleculares acima descritas, verifica-se um aumento da instabilidade genética, a qual se pode manifestar de dois modos: instabilidade cromossómica (CIN – *chromosomal instability*) ou instabilidade de microssatélites (MSI – *microsatellite instability*) [16,17]. A primeira encontra-se associada à maioria dos tumores esporádicos e aos tumores no contexto dos síndromas hereditários PAF e PAM e caracteriza-se pela presença de um número anormal de cromossomas (aneuploidia) devido a defeitos na mitose e na segregação cromossómica [17]. Este fenómeno traduz-se na perda de heterozigotia em vários genes supressores de tumor e está associado à tradicional sequência adenoma-carcinoma. A segunda é seguida pelos tumores associados ao síndrome de Lynch e a cerca de 15% dos tumores esporádicos como é explicado de seguida [16].

1.1.2.2. Instabilidade de microssatélites e o síndrome de Lynch

O síndrome de Lynch é a forma hereditária de CCR mais frequente. Este é uma doença hereditária, autossómica dominante, caracterizada pelo aparecimento de cancro numa idade jovem (aproximadamente 40 anos), ou seja, duas décadas mais cedo comparando com o CCR esporádico [3, 4, 7]. A maior parte dos doentes não apresenta um número elevado de pólipos e, ao contrário da maioria dos casos de CCR esporádico que se localizam no cólon esquerdo (distal ou descendente), o síndrome de Lynch é caracterizado pelo desenvolvimento de CCR no cólon direito (proximal ou ascendente) [18].

O síndrome de Lynch caracteriza-se por um defeito no sistema de reparação de erros no DNA do tipo *mismatch* (MMR), devido à presença de mutações germinais num dos genes de reparação do DNA, em cerca de 90% dos casos nos genes *MSH2* e *MLH1* e nos restantes 5 -10% no gene *MSH6*.

A incapacidade de reparação de erros no DNA devido à deficiência do sistema de reparação MMR resulta num aumento da taxa de mutações, dando origem ao

fenómeno de instabilidade de microssátelites (MSI) [3, 16, 19, 20]. Os microssátelites são pequenas sequências não codificantes repetitivas de mono-, di-, tri- ou tetra-nucleótidos localizadas em vários locais do genoma. Devido a sua sequência repetitiva existe uma maior probabilidade de, durante a replicação do DNA, a polimerase do DNA cometer erros e não replicar sequências repetitivas ou replicar diversas vezes a mesma sequência. Na ausência de um sistema de reparação MMR funcional estes erros não são reparados originando uma nova cadeia com menos ou mais nucleótidos, respectivamente [21]. A MSI é então caracterizada por uma variação de tamanho das sequências microssátelites no DNA tumoral por comparação com as do DNA normal do mesmo indivíduo. A deficiência no sistema MMR é responsável por um aumento de cerca de 1000 vezes a taxa de mutações pontuais no DNA podendo também ocorrer em genes supressores de tumor e outros genes que contenham sequências repetitivas, envolvidos no controlo do crescimento celular como por exemplo o *TCF7L2* ou o *BAX* [10]. Os tumores que não apresentam MSI são designados por MSS (*microsatellite stable*).

Para além das mutações nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, no caso do síndrome de Lynch, também a hipermetilação do promotor do gene *MLH1*, em CCR esporádico, tem sido associada à presença de MSI [22, 23]. De facto, no CCR esporádico com MSI, o qual se verifica em cerca de 15% dos casos de CCR, a hipermetilação do promotor do gene *MLH1* é um evento genético mais frequente do que a ocorrência de mutações na região codificante deste gene. Esta hipermetilação do promotor do gene *MLH1* resulta num silenciamento da transcrição do gene, originando uma diminuição da sua expressão [12, 23]. Actualmente a designação de síndrome de Lynch é aplicada apenas às famílias nas quais é detectada uma mutação germinal nos genes MMR. As famílias sem mutação germinal nestes genes, apesar de apresentarem características clínicas semelhantes são designadas por HNPCC (*hereditary non-polyposis colorectal cancer*).

1.2. Proliferação, diferenciação e apoptose no CCR

A homeostase celular e tecidual no epitélio cólico é fortemente dependente da coordenação das vias de sinalização, que resultam num equilíbrio entre proliferação, inibição de crescimento, diferenciação, senescência e apoptose. Uma desregulação destes processos biológicos contribui para o início da progressão da tumorigénese [24, 25]. Assim, alterações genéticas em genes específicos de vias de sinalização envolvidas nestes processos, como é o caso das vias de transdução de sinal WNT, RAS/RAF, da via das caspases ou da proteína p21, contribuem para a iniciação e

progressão tumoral e algumas têm sido associadas ao prognóstico ou à resposta à terapêutica no CCR.

1.2.1. Via de transdução de sinal WNT

No epitélio cólico, a via canónica WNT, também denominada via APC/ β -catenina, assume um papel determinante na regulação da homeostase celular. Os níveis de β -catenina e de APC regulam o equilíbrio entre proliferação, diferenciação e apoptose ao longo das criptas das células do cólon [26].

Na ausência de sinalização WNT extracelular, a proteína β -catenina encontra-se ligada a um complexo formado pelas proteínas axina, condutina, glicogénio sintase cinase 3β (GSK3 β) e APC. A formação deste complexo promove a fosforilação das proteínas axina, APC e β -catenina. A fosforilação da β -catenina no citoplasma actua como um sinal para o seu reconhecimento e ligação a um complexo responsável pela sua ubiquitinação e subsequente degradação proteolítica no proteossoma [4,10]. As mutações nos genes *APC* ou *CTNNB1*, o qual codifica a β -catenina, impedem a fosforilação desta proteína mediada pela GSK3 β e a sua subsequente degradação, o que origina a sua acumulação no citoplasma e, conseqüentemente, a sua translocação para o núcleo. Uma vez no núcleo, a β -catenina associa-se a factores de transcrição da família TCF (*T-cell factor*) e LEF (*lymphoid enhancer factor*), em particular ao *TCF7L2* no caso do epitélio cólico, actuando como um co-activador essencial à transcrição de genes alvo da via WNT envolvidos na proliferação e diferenciação celulares, na apoptose e no ciclo celular, como o *MYC* e a *ciclina D1* [10] (anexo I). As alterações no padrão de expressão destes e de outros genes alvo da via WNT irão afectar a renovação normal do epitélio cólico, devido ao aumento da taxa de proliferação celular e conduzir à progressão tumoral.

Assim, mutações no gene *APC* ou em outros genes envolvidos na via WNT como *CTNNB1* ou *AXINA2*, estas duas últimas exclusivas dos tumores com MSI, resultam numa activação desta via, permitindo o desenvolvimento tumoral [10, 13]. As mutações no gene *APC* são detectadas em cerca de 80% dos CCR MSS. Estas podem ser por perda de heterozigotia (LOH) ou mutações que resultam na introdução prematura de codões de terminação (codões *stop*), dando origem a proteínas de tamanho inferior ao da proteína normal, designadas por proteínas truncadas. Nos CCR MSI, a sua frequência é menor (aproximadamente 30-40%), mas em alternativa são identificadas mutações nos genes *CTNNB1* ou *AXINA2* em cerca de 40% dos tumores. Neste último grupo de tumores são também detectadas mutações no gene *TCF7L2*, as quais parecem levar a uma activação adicional da via WNT.

1.2.2. Via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK

A via de sinalização RAS/RAF/MEK/ERK está envolvida no controlo da proliferação, diferenciação, sobrevivência e apoptose em diferentes tipos de células [27]. Existem várias hormonas, factores de crescimento e de diferenciação assim como substâncias promotoras tumorais que podem activar esta via. A ligação de um destes ligandos activa uma proteína RAS induzindo a troca de GDP para GTP, o que converte a proteína na sua conformação activa. Seguidamente, a proteína RAS-GTP recruta a proteína cinase da serina/treonina RAF do citosol para a membrana plasmática, onde ocorre a activação desta última. A proteína RAF activada fosforila e activa a cinase MEK que, por sua vez, fosforila e activa a cinase ERK. Esta pode ainda entrar no núcleo de modo a controlar a expressão de genes alvo que promovem a progressão do ciclo celular (como as ciclinas do tipo D) [27, 28] (anexo II).

As mutações pontuais no gene *KRAS* ocorrem em cerca de 20 a 50 % dos CCR, sendo um evento molecular precoce na progressão de adenoma para carcinoma colorectal. Estas mutações provocam uma activação constitutiva da via, contribuindo para o fenótipo maligno, nomeadamente para a desregulação da apoptose e do crescimento celular do tumor, para o carácter invasivo e para a capacidade de indução da formação de novos vasos sanguíneos [29, 30]. O gene *KRAS* localiza-se no cromossoma 12 e apresenta 6 exões. A maior parte das mutações neste gene ocorrem nos codões 12, 13 e 61 e ocorrem tanto em tumores MSI como MSS.

1.2.3. Via do p21

O p21 é uma proteína de 21 kDa que pertence a família Cip/Kip de inibidores de cinase dependente da ciclina (CKI), onde se inclui também o p27 e o p57 [31].

O p21 tem a capacidade de regular e induzir a paragem do ciclo celular através da sua interacção com os complexos ciclina/CDK, os quais facilitam a transição do ciclo celular da fase G1 à S. Em resposta a lesões no DNA, o p21 é activado transcricionalmente pelo gene supressor de tumor *TP53* e inibe o complexo Cdk2/ciclina E. O p21 funciona assim como regulador da progressão do ciclo celular em G1 evitando desta forma que as células entrem na fase S (anexo III). O p21 é de facto um principal interlocutor da função do *TP53*, determinando a integridade do *checkpoint* celular [32, 33, 34].

Os níveis de p21 também podem ser regulados negativamente pelo proto-oncogene *MYC*, alvo da via WNT. O aumento da actividade de β -catenina na via WNT, por mutações num dos seus genes, correlaciona-se com o aumento dos níveis de *MYC*, levando a uma repressão do p21, o que por sua vez promove a proliferação celular e conduz à iniciação tumoral. Por outro lado, a redução da actividade desta via,

leva a uma regulação negativa do *MYC*, induzindo o p21, o que resulta na inibição do ciclo celular na fase G1 e no aumento da diferenciação [35].

A capacidade do p21 inibir a proliferação celular poderá contribuir para a função de supressor tumoral. Contudo o p21 pode também despoletar efeitos anti-apoptóticos ou pro-apoptóticos dependendo do contexto celular específico [36]. As funções anti-apoptóticas do p21 foram atribuídas a inúmeras interações moleculares. Uma destas reside na capacidade do p21 ser capaz de se ligar à pro-caspase 3 bloqueando desta forma o processo de activação da forma madura da caspase 3, levando por isso à resistência das células à apoptose [36]. No que diz respeito à função pró-apoptótica, foi descrito que o p21 era clivado proteoliticamente durante a apoptose e esta clivagem é directamente conduzida pela caspase 3. A clivagem proteolítica do p21 é um importante evento funcional que permite libertar o complexo ciclina/Cdk do inibidor p21, resultando desta forma uma elevada actividade ciclina cinase/Cdk na fase inicial da apoptose [37, 38]. O p21 pode assim actuar como um supressor tumoral ou como um oncogene, dependendo do *background* genético específico [36].

1.2.4. Via apoptótica das caspases

O termo apoptose foi adoptado pela primeira vez por Kerr e tal em 1972, sendo descrito como um fenómeno de morte celular programada. A apoptose pode ser despoletada por estímulos externos através de receptores específicos ou por estímulos internos de stress intracelular, tais como lesão do DNA ou perturbações no ciclo celular, nomeadamente por agentes terapêuticos. Esses estímulos levam a activação de caspases (*cysteine-dependent aspartate-proteases*) [39]. As caspases podem ser classificadas em iniciadoras (8, 9 e 10), as quais se encontram envolvidas na iniciação da cascata proteolítica, e em efectoras (3, 6 e 7), responsáveis pela clivagem de substratos [39]. A activação das caspases efectoras pode ser iniciada através de duas vias clássicas: extrínseca (citoplasmática) ou intrínseca (mitocondrial) [39, 40] (anexo IV).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligandos específicos a um grupo de receptores de membrana da família dos receptores TNF (*tumor necrosis factor*). Tal facto resulta na trimerização e consequente activação dos receptores de morte específicos. A ligação do TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand*) com os receptores DR4 e DR5, ou a ligação do FasL a receptores Fas resultam na activação das caspases iniciadoras 8 e 10, que por sua vez clivam e activam as caspases efectoras 3, 6 e 7, levando à apoptose [39, 40, 41].

A via intrínseca é activada através do stress intracelular ou extracelular, os sinais que são traduzidos em resposta a estes estímulos ocorrem principalmente na mitocôndria. Esta via apoptótica é assim iniciada pela libertação do citocromo c da mitocôndria para o citoplasma. No citosol, o citocromo c forma um complexo com APAF-1 (apoptosis-activating factor-1), ATP e caspase 9 que origina o *apoptossoma*. Este cliva e activa a caspase 9, o que leva a caspase 3, 6 e 7 a estimular a apoptose. Por sua vez, a caspase 3 activa pode activar a caspase 8 [39, 40, 41].

1.3. Marcadores de prognóstico no CCR

Em geral, as mutações somáticas em genes cruciais para a tumorigénese, têm demonstrado um valor de prognóstico limitado em doentes com CCR. Isso pode reflectir o facto de muitas dessas mudanças estarem associadas a um fenótipo molecular, por exemplo MSS ou MSI. Portanto, qualquer marcador somático estudado deve ser avaliado tendo em conta que qualquer correlação poderá ser influenciada pela instabilidade genómica.

As mutações em genes da via WNT ocorrem em mais de 90% dos CCR mas nem as mutações no *APC* nem no *CTNNB1* parecem ser um bom marcador de prognóstico. As mutações no *APC* que suprimem a ligação da proteína à β -catenina podem ser associadas a um pior prognóstico, no entanto, a sua aplicação à prática clínica poderá ser tecnicamente difícil. Os estudos sobre a associação das mutações no *KRAS* e o prognóstico são contraditórios. Alguns defendem que em geral as mutações no *KRAS* conferem um pior prognóstico enquanto outros não encontraram nenhuma associação. No entanto, um estudo posterior (que incluiu mais de 700 doentes) sugeriu que apenas a substituição de uma glicina por uma valina no codão 12 (G12V), se encontrava associada ao prognóstico [42].

Outra alteração genética frequente no CCR, que tem sido avaliada em estudos de prognóstico é a MSI. Os tumores MSI, tanto de origem hereditária (síndrome de Lynch) como esporádica, apresentam em geral características clínicas e patológicas distintas quando comparados com os tumores que não apresentam MSI, ou seja tumores MSS, os quais, na sua maioria, apresentam CIN. Os tumores MSI localizam-se preferencialmente no cólon direito, tendem a ser mucinosos, apresentam, com maior frequência, infiltração linfocitária, são menos diferenciados, menos invasivos e tendem a apresentar um melhor prognóstico, quando comparados com os tumores CIN [5,6]. Este facto pode estar relacionado com a presença mais frequente de infiltrado linfocitário nos primeiros, que poderá contribuir para uma melhor resposta imune. Por outro lado, os tumores MSI apresentam frequentemente uma expressão de p21 elevada, o que poderá contribuir também para esse melhor prognóstico [43]. De

facto, a perda de expressão do p21, parece ser um marcador independente de mau prognóstico em tumores MSI [44]. Nos tumores MSS a expressão de p21 é variável, o que poderá estar relacionado com, a maior frequência de mutações no *TP53*.

No que diz respeito à apoptose, a relevância dos níveis de apoptose para a sobrevivência ainda não é clara. Foi descrito que uma elevada actividade de caspase 3 se encontrava associada a um maior risco de recorrência [45]. A caspase 8 é sobre-expressa nos CCR, revelando uma expressão citoplasmática, nuclear e paranuclear, no entanto não se verificou ainda qualquer associação com o prognóstico [46, 47].

1.4. Marcadores preditivos de resposta à terapêutica no CCR

O tratamento do CCR levanta vários problemas, pois os resultados das várias terapêuticas permanecem insatisfatórios, nomeadamente na dificuldade em prever quais os doentes que melhor ou pior respondem aos fármacos. Vários fármacos têm vindo a ser utilizados, uma parte dos quais têm como consequência a indução da apoptose. O 5-Fluorouracilo (5-FU), frequentemente associado à leucovorina, irinotecano ou cisplatina continua a ser o fármaco mais utilizado na terapêutica do CCR apresentando maiores efeitos benéficos numa grande parte dos doentes [48]. A acção citotóxica do 5-FU envolve a sua conversão em fluoronucleótidos, nomeadamente FdUMP. Estes são incorporados no DNA e no RNA durante a respectiva síntese, levando a vários efeitos biológicos que podem despoletar a morte celular por apoptose [49]. A enzima timidilato sintetase (TS) converte o dUMP em dTMP, que é necessário posteriormente para a síntese de DNA. A inibição da actividade desta enzima resulta na supressão da proliferação e crescimento celular, sendo o mecanismo anti-tumoral do 5-FU mais importante [42, 50, 51]. No entanto, o nível de expressão da TS é elevado em muitos casos, o que é um sério obstáculo no uso clínico do 5-FU. Vários estudos têm demonstrado que níveis elevados de TS se correlacionam com pior prognóstico em doentes com CCR ou outros tumores malignos. No entanto, é de realçar que a exposição a inibidores da enzima TS poderá levar à sobre-regulação da expressão da mesma [42, 49, 50].

Um dos factores que parece modular a resposta à terapêutica é a expressão de p21. O p21 funciona como um regulador da TS, ou seja, quando existe uma elevada expressão de p21 vai existir também uma elevada expressão da enzima TS, o que piora a sensibilidade do 5-FU [51, 52]. Por outro lado, a modulação da expressão de p21 pode alterar a resposta à apoptose resultante de quimioterapia. As lesões no DNA causadas por estes tratamentos em linhas celulares de CCR MSI, induzem a estabilização do p53, o que leva a paragem do ciclo celular pela activação transcricional do p21. No entanto, foi demonstrado que a sobre-expressão do *MYC*

nessas células reprimia o p21, o que conduzia à apoptose. Este facto indica que a supressão do p21 pelo *MYC* pode ser benéfica na terapia tumoral pela sensibilização das células tumorais a drogas que induzem a apoptose. Da mesma forma, uma elevada expressão de p21 pode atenuar esta resposta à terapêutica através da paragem do ciclo celular e da reparação do DNA [35]. Alterações genéticas nos genes *APC* e *CTNNB1* que activam a via WNT, cujo um dos genes alvos é o *MYC*, poderão contribuir para um melhor esclarecimento a este nível.

Também a baixa actividade da caspase 3 na mucosa normal e em tumores foi descrita como um factor independente preditivo da recorrência de tumores em doentes com CCR que são sujeitos a quimioterapia adjuvante com 5-FU, correlacionando-se com um pior prognóstico e uma elevada taxa de recorrência [53].

Para além das diferenças em termos de prognóstico, os doentes com tumores MSS e MSI, parecem apresentar também diferentes respostas à terapêutica, embora os estudos não sejam unânimes. De modo a diminuir a probabilidade de recidiva, os doentes com tumores do cólon, em estadio avançado (estadio III), são submetidos a quimioterapia adjuvante com base no 5-FU, tendo desta forma demonstrado benefícios num determinado número de doentes (preferencialmente com tumores MSS), o mesmo não acontecendo noutros (com tumores MSI). Pensa-se que isto seja devido ao facto de estes apresentarem resistência à apoptose induzida pelo 5-FU, ou seja, um sistema MMR funcional é necessário para a citotoxicidade em resposta a incorporação do 5-FU no DNA, além dos seus efeitos mediados pela inibição da TS [42, 48].

Deste modo, é importante que qualquer correlação com a sobrevivência no CCR, de modo a identificar factores preditivos de prognóstico ou de resposta à terapêutica, seja efectuada em tumores estratificados de acordo com a presença ou ausência de MSI. Tendo em conta a importância de alterações genéticas envolvidas na manutenção do equilíbrio entre a proliferação, diferenciação e apoptose para a iniciação e progressão do CCR, continua a ser importante estudar essas alterações, assim como a expressão de proteínas envolvidas nestes processos, de modo a perceber eventuais correlações com o prognóstico e a resposta à terapêutica. Assim, o estudo de mutações em genes específicos das vias de sinalização WNT e RAS/RAF, assim como da expressão de marcadores de proliferação/diferenciação ou de apoptose, em tumores estratificados quanto à MSI, e a sua correlação com a sobrevivência, poderá contribuir para melhorar os poucos conhecimentos existentes nesta área.

2. Objectivos

2.1. Objectivo geral

O objectivo geral deste trabalho consistiu em estudar, em diferentes tipos de CCR, a expressão de proteínas específicas envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose, e correlacionar com a presença de alterações genéticas em vias de sinalização, envolvidas nestes processos (WNT e RAS/RAF), e com a sobrevivência, de modo a melhorar o conhecimento sobre o prognóstico e a resposta à terapêutica. Esta análise poderá ter uma possível implicação na identificação de factores preditivos de prognóstico e de resposta à terapêutica.

2.2. Objectivos específicos

- 1) Estudar a expressão da proteína p21, envolvida no ciclo celular e das caspases 3 e 8, envolvidas na apoptose, em tumores do cólon e recto, estratificados pela presença ou ausência de MSI.
- 2) Estudar a expressão da proteína APC de modo a inferir a presença de mutações com base na sua expressão.
- 3) Correlacionar os resultados obtidos em 1) com:
 - a. As alterações moleculares em genes específicos das vias APC/ β -catenina (*APC*, *CTNNB1*, *TCF7L2*) e RAS/RAF (*KRAS*), envolvidas na proliferação, diferenciação e apoptose (na sua maioria identificadas no âmbito de um projecto anterior);
 - b. A sobrevivência na presença ou ausência de terapêutica, de modo a identificar factores que se possam associar ao prognóstico e à resposta à terapêutica.

3. Material e métodos

3.1. Material biológico

Este estudo compreendeu duas fases distintas, a análise de expressão das proteínas p21, APC, caspase 3 e caspase 8 por imunohistoquímica e a análise mutacional dos genes *CTNNB1* (*β-catenina*) e *KRAS* em tumores do cólon e recto. No primeiro caso, o material biológico utilizado consistiu em amostras de tecido de tumores do cólon e recto, incluídas em blocos de parafina. Estes foram obtidos no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa Francisco Gentil E.P.E. As amostras foram seleccionadas pelo médico anatomopatologista através de cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina. A técnica de imunohistoquímica foi realizada num total de 94 amostras, das quais 33 pertenciam a indivíduos com síndrome de Lynch (18 com mutação germinal no *MLH1*, 14 com mutação germinal no *MSH2* e 1 com mutação germinal no *PMS2*), 27 a indivíduos com HNPCC (9 MSS e 18 MSI), 13 pertenciam a indivíduos com CCR esporádico com MSI e 21 correspondiam a indivíduos com CCR esporádico MSS (anexo V). A pesquisa de mutações nos genes *CTNNB1* e *KRAS* foi efectuada num estudo prévio para a maioria das amostras da referida série de tumores. No presente estudo foi efectuada a análise mutacional do *KRAS* em 15 amostras de tumor de indivíduos com HNPCC e 5 amostras de tumor de indivíduos com CCR esporádico MSS (anexo VI). Relativamente ao gene *CTNNB1*, a pesquisa de mutações foi efectuada em 3 amostras de tumores HNPCC. Foram analisadas um total de 18 amostras de tumor de indivíduos com HNPCC e 5 amostras de tumores de indivíduos com CCR esporádico MSS.

Todas as soluções utilizadas nos diferentes métodos, apresentados de seguida, encontram-se descritas no anexo VII.

3.2. Métodos

3.2.1. Análise da expressão das proteínas p21, APC, caspase 3 e caspase 8 por imunohistoquímica

Foi efectuada um estudo de expressão de proteínas por imunohistoquímica utilizando os seguintes anticorpos (Ac): p21, APC, caspase 3 e caspase 8 (tabela 1). Os Ac primários podem ser monoclonais ou policlonais. Os Ac monoclonais são produzidos por um só clone de plasmócitos, logo, só reagem com um determinado epitopo do antígeno (Ag) possuindo desta forma uma alta especificidade e afinidade. Os Ac policlonais apresentam vários Ac produzidos por vários clones de plasmócitos,

reagindo assim com diversos epítomos de um Ag. A grande vantagem é a capacidade de detectar um Ag mesmo na ausência de vários dos seus epitopos [54, 55].

Para cada anticorpo foi utilizado um controlo positivo (adenocarcinoma mucinoso do cólon) e o controlo negativo foi efectuado através da omissão do Ac primário.

Ac	Marca/Ref.	Clone	Origem	Diluição	Incubação
p21	DAKO / M 7202	SX118	Monoclonal de ratinho	1:100	22h, 4°C
Apc (C-20)	Santa Cruz / sc-896	-	Policlonal de coelho	1:1250	22h, 4°C
Caspase 3	Cell Signaling / Asp175	-	Policlonal de coelho	1:400	22h, 4°C
Caspase 8	Cell Signaling / Asp391	18C8	Monoclonal de coelho	1:50	22h, 4°C

Tabela 1 – Diluição e condições de incubação utilizadas para cada Ac primário.

Os tecidos em estudo foram fixados com formol a 10% tamponado (tampão fosfato), que tem como finalidade prevenir a autólise e imobilizar as estruturas celulares o mais próximo do seu estado vivo e, após o processamento histológico, foram incluídos em blocos de parafina [56].

Os blocos parafinados foram cortados em micrótomo de corrediça (Leica®) com 3µm de espessura e colocados em lâminas adesivadas (Menzel-Gläsen® *super frost plus*) para evitar a perda do material histológico, impossibilitando assim a avaliação das lâminas. Estas, foram colocadas na estufa a 65°C durante 60 minutos com o objectivo de secar e eliminar o excesso de parafina que circunda o tecido, permitindo uma maior adesão do corte à lâmina. Em seguida os tecidos foram desparafinados e hidratados, ou seja, as lâminas foram colocadas em xilol durante 15 minutos, para remover completamente a parafina dos espaços intra e extra celulares e passadas por concentrações decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e finalmente colocadas em água [55].

Posteriormente, a actividade da peroxidase endógena que existe em várias estruturas como é o caso dos eritrócitos, baço, rins, fígado, medula óssea e em áreas com necrose, foi bloqueada por um excesso de substrato (peróxido de hidrogénio) que leva a saturação da actividade enzimática. Para a inibição efectiva da peroxidase endógena foi utilizada uma solução de peróxido de hidrogénio (Merck®) a 3% em metanol (Merck®) [54, 55, 56].

Como a fixação dos tecidos provoca a formação de uma rede proteica que “mascara” os Ag podendo originar falsos negativos, é essencial a recuperação antigénica (RA) para tornar os Ag acessíveis ao Ac. Existem dois métodos de recuperação antigénica, nomeadamente, a digestão enzimática e a alta temperatura. A

alta temperatura baseia-se na transferência de energia para os tecidos, provocando a quebra das pontes de metileno promovidas na fixação pelo formol, ao contrário da digestão enzimática em que as enzimas (hidrolases) destroem as ligações peptídicas. A recuperação por alta temperatura, pode ser efectuada em microondas, panela de pressão, banho-maria a 98°C ou módulo PT (*Pre-treatment*, DAKO PT) e os tampões mais utilizados são o tampão citrato de sódio 0.001M pH 6.0 e o tampão Tris-EDTA (ácido etilenodiamino-tetra-acético) 1mM pH 8.0 [54, 55]. As várias condições utilizadas na recuperação antigénica para cada anticorpo encontram-se descritas na tabela 2.

Ac	RA	Tampão	Tempo
p21	Módulo PT (94°C)	DAKO Flex High pH 9(DM828) ¹	20 min.
Apc (C-20)	Microondas (750W)	Citrato sódio pH 6	35 min.
Caspase 3	Microondas (750W)	Tris-EDTA pH 8	30 min.
Caspase 8	Microondas (750W)	Tris-EDTA pH 8	30 min.

Tabela 2 – Condições de recuperação antigénica utilizadas para os vários anticorpos.

De seguida procedeu-se à incubação dos tecidos com o Ac primário. A diluição deste é um ponto muito importante para o sucesso da técnica de imunohistoquímica. A diluição ideal é a que permite obter maior intensidade de marcação específica, com o menor *background*. Os Ac primários foram diluídos numa solução comercial (DAKO Real™) de diluente de Ac (tabela 1). As lâminas com os respectivos Ac primários foram incubadas numa câmara húmida a 4°C durante a noite (*overnight- ON*, 22h) [54, 55].

Existem diversos métodos imunohistoquímicos que podem ser utilizados para localizar os Ags tecidulares, os quais se podem dividir em métodos directos e indirectos que se distinguem essencialmente, os primeiros pela utilização de somente um Ac e os segundos pela utilização de dois Ac (Ac primário e Ac secundário) [54, 55].

Neste estudo foi utilizado o método do polímero indirecto que consiste na aplicação de um Ac primário dirigido contra o Ag pretendido. Posteriormente, e após duas lavagens com uma solução tampão, que tem como objectivo “arrastar” os Ac que não se ligaram especificamente, aplica-se um polímero de dextrano, ao qual estão acoplados Ac secundários contra imunoglobulinas de ratinho e coelho, e substâncias que tornam possível a visualização, a enzima HRP (*horseradish peroxidase*). Este método tem como vantagem a sua rapidez e facilidade de execução, evidenciando

¹ Esta solução possui três tipos de acções, nomeadamente, desparafinação, hidratação e recuperação Ag.

uma diminuição de factores de erro, e, adicionalmente, é um método muito amplificativo. No entanto, apresenta como desvantagem o facto de ser relativamente dispendioso [54, 55]. Para o Ac p21 foi utilizado o sistema de amplificação DAKO EnVision™ Flex, que consistiu na aplicação de um reagente intermédio (DAKO) *Linker anti-mouse* durante 15 min, com o objectivo de obter uma maior amplificação, seguida da aplicação da HRP durante 30 min. Nos restantes Acs, nomeadamente, APC, Caspase 3 e 8, foi aplicado o sistema de amplificação DAKO REAL™ EnVision durante 30 min.

Estes métodos, através da reacção enzima (HRP) – substrato (peróxido de hidrogénio), originam um produto final colorido, a partir dos denominados cromogéneos. Os tecidos foram cobertos durante 8 minutos com uma solução reveladora constituída por um cromogéneo - DAB (3.3` – *diaminobenzine tetrahydrochloride*) e peróxido de hidrogénio. Devido à acção do DAB como dador de electrões, na presença da peroxidase, verifica-se uma oxidação do seu grupo protético heme, o que vai originar a formação de um precipitado castanho insolúvel, tornando possível a visualização ao microscópio óptico dos imunocomplexos formados [54, 55].

A coloração de contraste, foi efectuada com hematoxilina de Mayer (Merck®) durante 1 minuto, tendo como principal função, a contextualização da marcação no tecido.

Por fim os tecidos são desidratados com concentrações crescentes de etanol (70%, 95%, 100%) até ao xilol e montadas com meio de montagem sintético – *entellan* (Merck®).

A análise da expressão obtida por imunohistoquímica com os anticorpos p21, APC, caspase 3 e caspase 8 foi realizada utilizando o microscópio óptico (Leitz®), mediante uma avaliação semi-quantitativa da imunomarcação nas zonas neoplásicas. O Ac p21 possui uma marcação nuclear e os restantes Ac, nomeadamente, APC, caspase 3 e 8 possuem marcação citoplasmática e nuclear. A leitura dos resultados foi feita de forma independente por três avaliadores, sendo o *score* utilizado semi-quantitativo, ou seja, <10%, 10-25%, 25-50%, 50-75%, 75%-95% e > 95% das células tumorais. Portanto determinou-se a porção de células tumorais positivas num total de todas as células tumorais. É de realçar que nos casos em que existiu discordância de resultados entre os três avaliadores, a decisão final foi do observador mais experiente, ou seja, do médico anatomopatologista.

No caso da proteína APC, foi considerada a presença de mutação no tumor nos casos em que a expressão da proteína foi inferior a 25%. Esta percentagem foi definida com base na expressão obtida em amostras de tumor para as quais era conhecido o estado mutacional. Por este motivo, foi utilizado um Ac carboxi-terminal

de modo a que uma ausência ou forte redução da expressão estivesse associada à presença de mutações truncantes no gene *APC*.

3.2.2. Análise mutacional dos genes *CTNNB1* e *KRAS*

3.2.2.1. Amplificação de DNA recorrendo à técnica de Polymerase Chain Reaction (PCR)

As amostras de DNA analisadas no presente trabalho para a presença de mutações no exão 2 do gene *KRAS* e no exão 3 do gene *CTNNB1* foram isoladas no âmbito de um estudo anterior, a partir de tecido incluído em parafina, através de um método de extracção com fenol/clorofórmio. A razão para a amplificação de apenas estes exões reside no facto de a vasta maioria das mutações nestes genes, descritas na literatura em CCR, se localizar nestes exões.

De modo a proceder à pesquisa de mutações, os fragmentos de DNA correspondentes aos exões acima referidos foram amplificados através da técnica de PCR. Esta técnica permite a amplificação enzimática *in vitro* de uma região específica do DNA, do qual se conhece a sequência das suas extremidades 5' e 3', através de ciclos de duplicação levados a cabo por uma enzima – DNA polimerase [57, 58]. Para a amplificação de determinada sequência são usados dois *primers* (oligonucleótidos iniciadores, sintetizados quimicamente) com sequências complementares de regiões que se encontram em cadeias opostas e flanqueiam a zona de DNA a amplificar, permitindo assim a síntese de novas moléculas de DNA [57, 60, 61].

Na primeira etapa da reacção de PCR, o DNA sofre uma desnaturação a 95°C durante 5 minutos. Na segunda etapa ocorre a hibridação dos *primers* com as cadeias molde a uma temperatura que é característica de cada fragmento. Durante a terceira etapa, a extensão, normalmente entre 70-72°C, os *primers* são prolongados pela incorporação de 5'-trifosfatos-2'-desoxiribonucleósidos (dNTPs) por uma polimerase de DNA termostável, isolada da bactéria termófila *Thermus aquaticus* YT1, denominada *Taq* DNA polimerase [61]. Em suma, um conjunto de ciclos térmicos resulta na amplificação exponencial do fragmento de DNA flanqueado pelos *primers* [61]. Por fim é realizada uma extensão final dos *primers* a 72°C durante 10 minutos, para garantir que todas as cadeias de DNA sejam terminadas [61].

Entre os factores que mais influenciam a reacção de PCR encontram-se a concentração de magnésio (Mg^{2+}), de *primers*, e da temperatura de hibridação. As condições de amplificação para cada exão, nomeadamente as concentrações dos vários reagentes acima descritos, assim como a temperatura de hibridação dos *primers*, encontram-se descritas no anexo VIII tendo sido utilizada a *Taq* DNA polimerase (nativa) da Invitrogen.

Neste trabalho, para a amplificação dos exões 2 e 3, respectivamente dos genes *KRAS* e *CTNNB1*, foi utilizado um programa de PCR que consistiu em 40 ciclos. Este programa encontra-se apresentado na tabela 3.

	Temperatura	Tempo	Ciclos
Desnaturação inicial	95°C	5 min	
Desnaturação	94°C	1 min	
Hibridação	Variável	50 seg	40
Extensão inicial	72°C	50 seg	
Extensão final	72°C	10 min	

Tabela 3 – Programa de PCR utilizado para amplificação dos exões 2 e 3, respectivamente dos genes *KRAS* e *CTNNB1*.

3.2.2.2. Controlo da eficiência da reacção de PCR em gel de agarose

Terminada a reacção de PCR, foi avaliada a eficiência do produto amplificado. Esta foi realizada em gel de agarose 2% (p/v), ao qual foi adicionado brometo de etídio, de maneira a que fosse possível a visualização das bandas correspondentes aos fragmentos de DNA amplificados. Como marcador de peso molecular foi utilizado o marcador VIII (Roche), com uma gama de fragmentos entre 19 e 1114. Este permitiu confirmar o tamanho (em pb) do fragmento de DNA obtido após a reacção de PCR. Retiraram-se 3µl de produto de PCR correspondente a cada amostra de DNA, aos quais se adicionaram 7µl da solução *Orange G* 1x, tendo de seguida este volume sido aplicado no gel de agarose 2%. A visualização das bandas foi efectuada através da fluorescência emitida pelo brometo de etídio, incorporado nas moléculas de DNA, após exposição do gel a radiação ultravioleta.

3.2.2.3. Reacção de sequenciação

O método utilizado para a sequenciação baseia-se no método de *Sanger*, envolvendo a incorporação de didesoxirribonucleotídeos (ddNTPs) durante uma reacção de PCR a partir do fragmento previamente amplificado. Estes têm a particularidade de não possuírem o grupo hidroxilo na posição 3', pelo que a síntese da cadeia de DNA pára quando é incorporado um destes nucleótidos modificados. Cada ddNTP (ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP) encontrava-se marcado com fluorescência (quatro fluorocromos diferentes) sendo incorporados durante a reacção de sequenciação. No final obtêm-se vários fragmentos de PCR amplificados, diferindo em 1pb, correspondendo à incorporação em cada posição de um ddNTP. Para a reacção de sequenciação utilizou-se o kit *Big-dye terminator cycle sequencing* da Applied-Biosystems e procedeu-se de acordo com o protocolo do fabricante.

3.2.2.4. Precipitação e purificação do produto da reacção de sequenciação

Os produtos da reacção de sequenciação foram precipitados de modo a remover os ddNTPs não incorporados que provocam ruído de fundo, seguido de purificação dos referidos produtos de modo a remover possíveis inibidores, como os resíduos de etanol ou de sal. Este passo consistiu em 4 etapas: 1) Precipitação do produto da reacção de sequenciação com a adição de uma mistura de 50µL de etanol absoluto, 2µL de acetato de sódio 3M (pH 4,6) e 2µL de EDTA 125mM a um tubo de 1,5mL; 2) Centrifugação do mesmo a 14000rpm durante 30 minutos a 4°C e remoção do sobrenadante; 3) Adição de etanol a 70% (v/v) e centrifugação a 14000rpm durante 15 minutos a 4°C; 4) Remoção do sobrenadante seguido da secagem do *pellet* a 37°C.

3.2.2.5. Análise das amostras no sequenciador automático

Após a precipitação, foi necessário preparar as amostras para análise no sequenciador automático *ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)*. Ao *pellet* seco correspondente à amostra, adicionaram-se 18µl de formamida desionizada (*Applied Biosystems*) e procedeu-se à sua desnaturação num banho seco a 95°C durante 10 minutos. De seguida colocou-se em gelo, de forma a impedir a renaturação do produto anteriormente sintetizado. Seguidamente, adicionou-se todo o volume do produto desnaturado a tubos de 0,2mL. Estas amostras foram então injectadas através do capilar do sequenciador automático (*ABI PRISM 310 Genetic Analyser Applied Biosystems*). Por excitação dos fluorocromos através do laser de árgon é possível capturar a emissão da cor, a qual através de um *software* de computador acoplado ao sequenciador permite a identificação e análise da sequência de bases do fragmento.

3.3. Análise estatística

A associação entre a expressão das proteínas por imunohistoquímica e a análise molecular foi avaliada através do teste exacto de Fisher. Foi realizada a análise de sobrevivência através do método Kaplan-Meier no cálculo das curvas de sobrevivência, e o teste *log rank* na comparação das mesmas. A sobrevivência dos doentes foi avaliada aos 5 anos, após o diagnóstico.

Para todos os testes, o valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4. Resultados e discussão

4.1. Análise da expressão por imunohistoquímica em tumores com síndrome de Lynch, HNPCC, esporádicos MSI e MSS

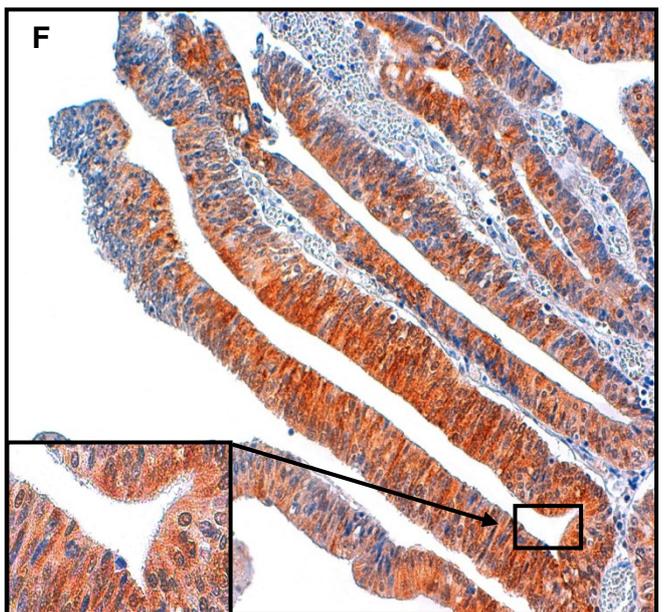
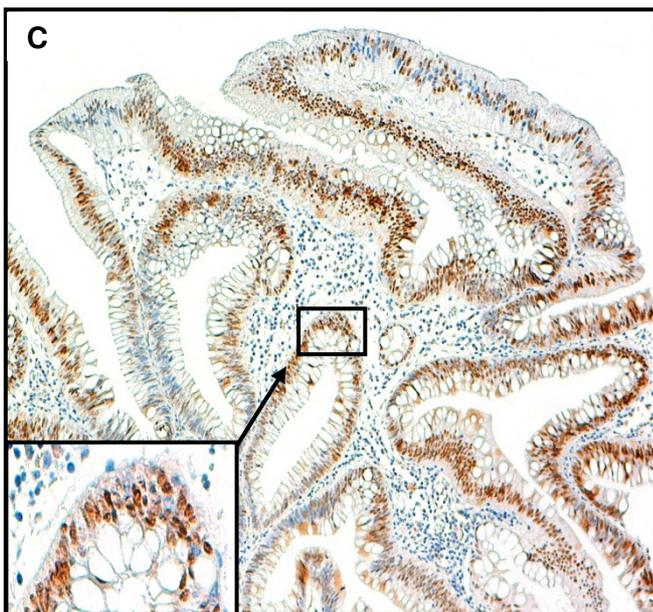
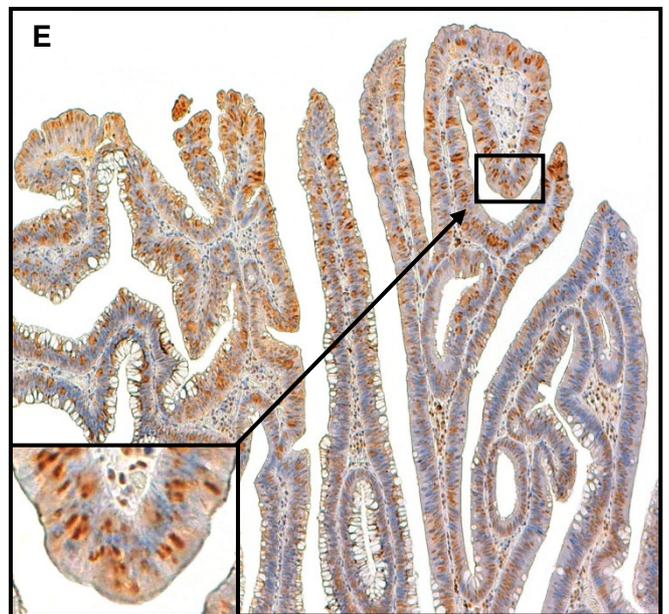
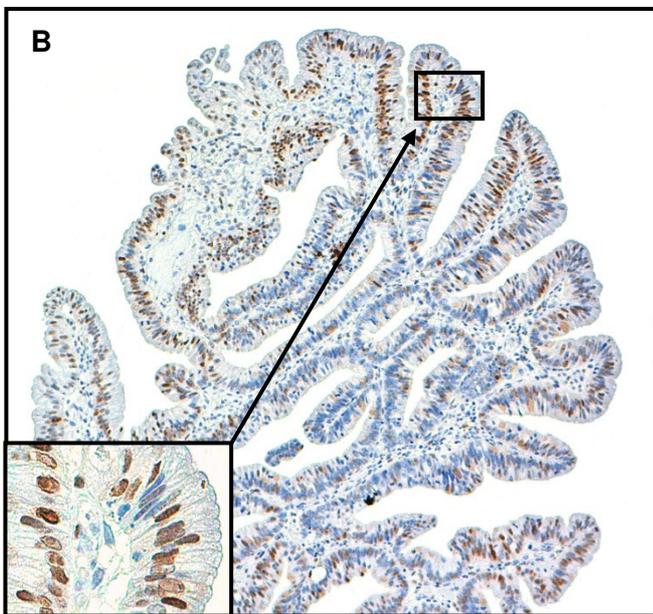
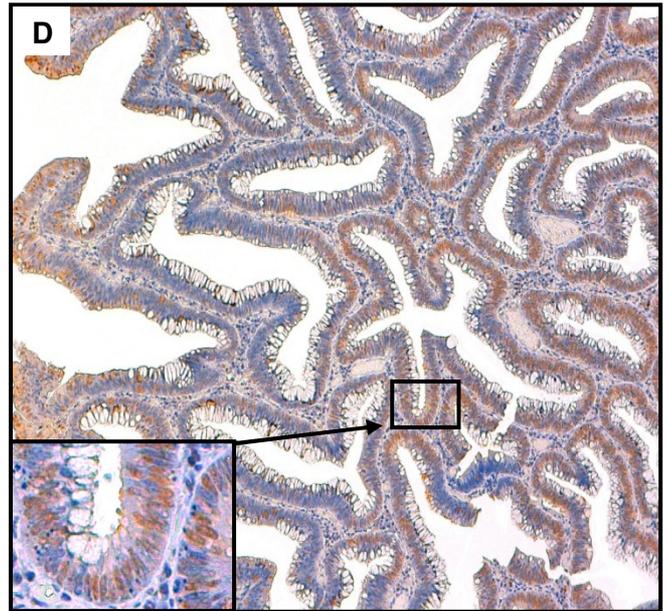
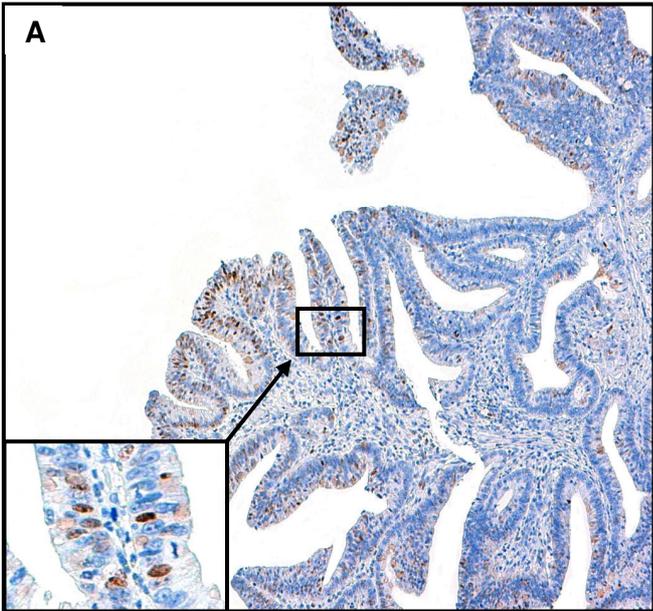
Na maioria dos tumores verificou-se que a expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 foi superior em relação ao tecido normal, o que está de acordo com o descrito [14, 15, 35]. No caso da proteína APC verificou-se uma expressão inferior no tumor em relação ao tecido normal. É de realçar que a expressão das proteínas p21 e APC foi superior no topo das criptas do epitélio cólico normal onde se verifica diferenciação e apoptose, existindo uma gradação de marcação, diminuindo até à base das mesmas onde as células se encontram em divisão. No caso das caspases 3 e 8 verificou-se também uma maior expressão no topo das criptas normais, tendo-se verificado nas células normais um padrão de marcação inferior em comparação com o tumor. Os resultados da expressão destas proteínas nos vários tumores do cólon e recto analisados encontram-se apresentados no anexo V.

Como foi referido no ponto 3.2.1 a expressão da proteína APC foi utilizada para inferir quanto ao estado mutacional do gene, uma vez que a ausência ou forte redução de expressão é sugestiva de mutação, devido à localização carboxi-terminal do epitopo e ao facto de as mutações originarem uma proteína truncada. Assim, os resultados respeitantes as mutações neste gene encontram-se representados no anexo V.

A expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 variou entre <10% a 50-75%, <10% a 25-50% e <10 a 95% das células tumorais, respectivamente. Na figura 2 são apresentados alguns exemplos desta avaliação semi-quantitativa da expressão para os vários anticorpos. Para analisar a expressão entre os diversos tipos de tumores foi utilizado para todas as proteínas um *cut-off* de 10%, seleccionado de acordo com a literatura, ou seja, para cada tipo de tumor foram avaliados os casos com expressão igual ou superior a 10% [62, 63].

p21

APC



Caspase 3

Caspase 8

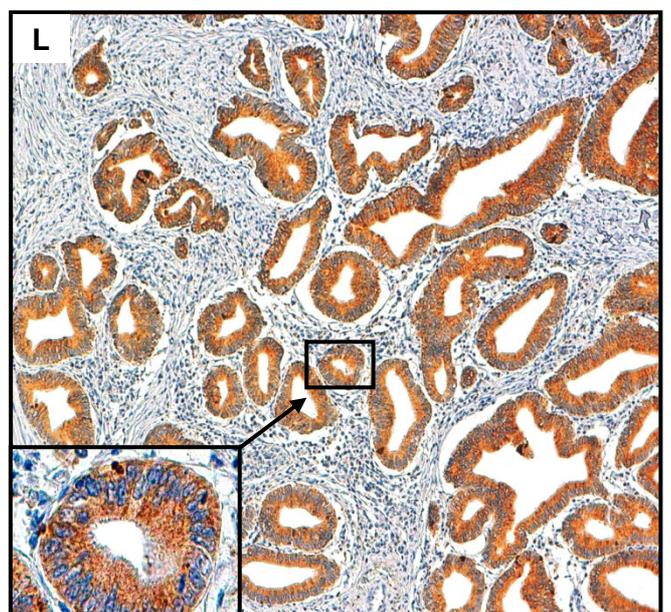
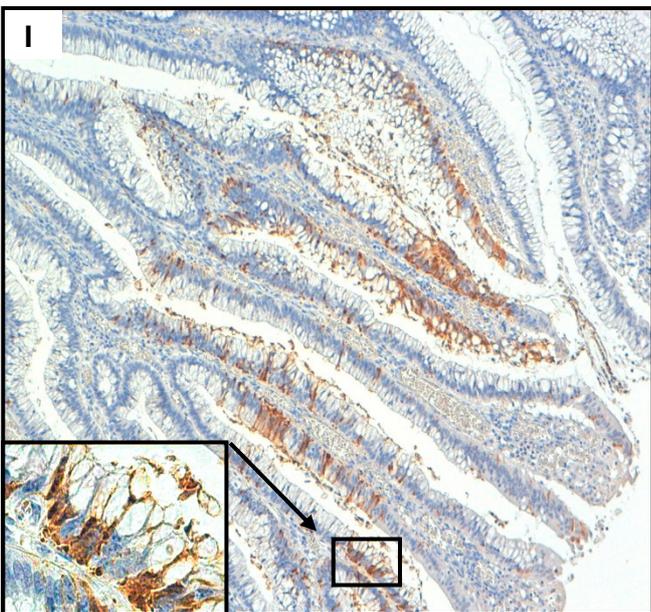
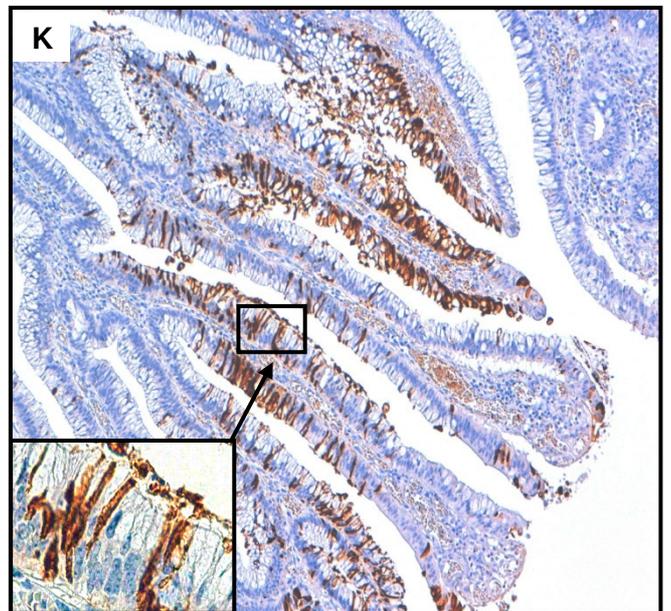
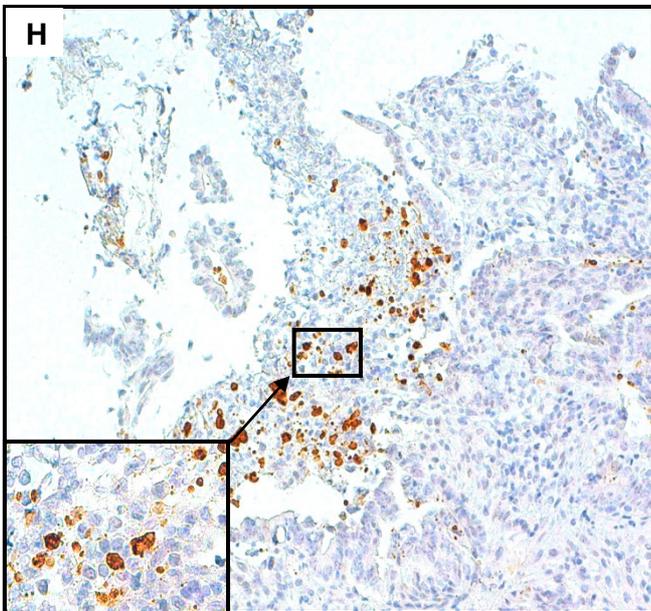
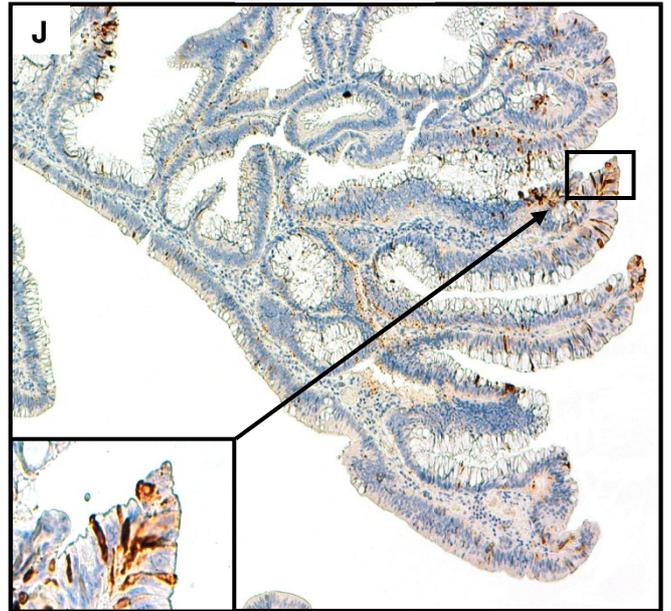
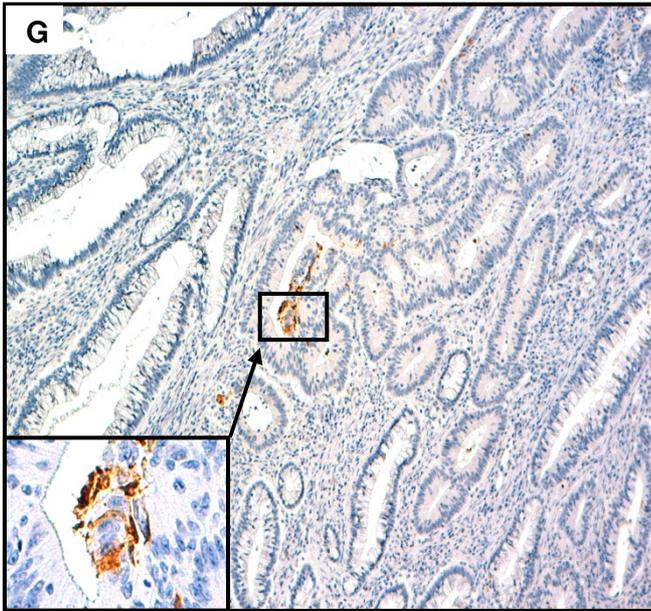


Figura 2 – Expressão das proteínas p21, APC, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica em tecidos incluídos em parafina para algumas das amostras de CCR analisadas.

A) Expressão de p21 inferior a 10% (100x, 400x). **B)** Expressão de p21 entre 10-25% (100x, 400x). **C)** Expressão de p21 entre 50-75% (100x, 400x). **D)** Expressão de APC inferior a 10% (100x, 400x). **E)** Expressão de APC entre 10-25% (100x, 400x). **F)** Expressão de APC entre 50-75 (200x, 400x). **G)** Expressão de caspase 3 inferior a 10% (100x, 400x). **H)** Expressão de caspase 3 entre 10-25% (200x, 400x). **I)** Expressão de caspase 3 entre 25-50% (100x, 400x). **J)** Expressão de caspase 8 inferior a 10% (100x, 400x). **K)** Expressão de caspase 8 entre 25-50 % (100x, 400x). **L)** Expressão de caspase 8 superior a 95% (100x, 400x).

4.1.1. Expressão de p21

Verificou-se que o número de tumores com expressão de p21 superior a 10% foi menor nos tumores esporádicos MSS (8/21; 38%) e mais elevado nos tumores de SL (25/33; 76%), diferença esta que é estatisticamente significativa ($p=0,005$) (tabela 4). Entre os restantes grupos de tumores não se observaram diferenças significativas. No entanto, verificou-se uma tendência para a expressão de p21 ser maior nos tumores de Lynch, HNPCC e esporádicos MSI e menor nos esporádicos MSS (a expressão foi superior a 10% em cerca de 70% dos tumores no primeiro grupo e em 38% nos tumores esporádicos MSS). Inclusivamente, a diferença entre os tumores esporádicos MSS e os tumores de SL é estatisticamente significativa [13/21 (62%) vs 8/33 (24%) apresentam expressão em menos do que 10% das células tumorais, $p=0,005$]. Desta forma, à excepção do grupo HNPCC MSS, cuja causa molecular da doença ainda é desconhecida, a expressão de p21 parece variar com a instabilidade de microssatélites visto que o número de tumores com elevada expressão de p21 é superior no grupo MSI em relação ao MSS. Este facto encontra-se de acordo com estudos anteriores [43] e pode ser atribuído a dois factores principais. O primeiro deve-se ao facto do p21 ser activado pelo *TP53 wild type* [33], e uma vez que os tumores com instabilidade de microssatélites possuem menos frequentemente mutações no gene *TP53* [64] então é de esperar uma elevada expressão de p21. Por outro lado, a via WNT também possui um papel importante na expressão do p21, ou seja, quando a via WNT encontra-se activada o p21 é regulado negativamente pela sobre-expressão do gene *MYC* [35, 65]. Uma vez que as mutações na via WNT são menos comuns nos tumores MSI do que nos MSS [66] pode-se esperar que os tumores MSI tenham elevada expressão de p21. Este facto pode contribuir para o melhor prognóstico destes tumores, uma vez que uma baixa expressão de p21 foi associada a um pior prognóstico [44].

Nos restantes grupos de tumores não se observou nenhuma correlação significativa.

Tumores	Expressão por imunohistoquímica					
	p21		Caspase 3		Caspase 8	
	<10%	≥10%	<10 %	≥10%	<10%	≥10%
Esporádicos MSS (21)	13 (62%) ^a	8 (38%) ^a	17 (80%) ^b	4 (20%) ^b	12 (57%) ^c	9 (43%) ^c
Esporádicos MSI (13)	5 (38%)	8 (62%)	9 (69%)	4 (31%)	2 (15%) ^c	11 (85%) ^c
HNPCC MSS (9)	3 (33%)	6 (67%)	4 (44%)	5 (56%)	4 (44%)	5 (56%)
HNPCC MSI (18)	4 (22%)	14 (78%)	12 (67%)	6 (33%)	7 (39%)	11 (61%)
S. Lynch (33)	8 (24%) ^a	25 (76%) ^a	18 (55%) ^b	15 (45%) ^b	13 (39%)	20 (61%)
S. Lynch <i>MLH1</i> (18)	6 (33%)	12 (67%)	12 (67%)	6 (33%)	4 (22%) ^d	14 (78%) ^d
S. Lynch <i>MSH2</i> (14)	1 (7%)	13 (93%)	5 (36%)	9 (64%)	8 (57%) ^d	6 (43%) ^d

Tabela 4 – Expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 nos vários tipos de tumores do cólon e recto estratificados por natureza esporádica ou hereditária e por instabilidade de microssatélites.

Legenda: a) p=0,005; b) p=0,03; c) p=0,01; d) p=0,04.

4.1.2. Expressão da Caspase 3

No geral, a maioria dos tumores apresentou uma expressão de caspase 3 em menos de 10% das células do tumor, independentemente da instabilidade de microssatélites. No entanto, tal como no caso do p21 também se verificou uma maior expressão de caspase 3 nos tumores de SL em relação aos tumores esporádicos MSS, a qual foi estatisticamente significativa ($p=0,03$). De acordo, o número de tumores com expressão de caspase 3 em mais de 10% das células foi mínimo nos primeiros (4/21; 19%) e mais elevado nos segundos (15/33; 45%). No entanto, este resultado não se verificou nos tumores esporádicos com MSI. De facto, foi descrito que a expressão de caspase 3 é superior nos tumores do cólon direito e com elevada reacção linfocitária, podendo mesmo estar relacionada com um maior risco de recorrência. Visto que os tumores associados ao SL possuem mais frequentemente as características anteriormente mencionadas, isto está de acordo com a elevada expressão de caspase 3 em comparação com os tumores MSS [45].

Nos tumores de SL verificou-se que a expressão de caspase 3 diferiu entre tumores de doentes com mutação germinal no gene *MSH2* ou no gene *MLH1*. No caso da mutação germinal se localizar no *MSH2*, os tumores apresentaram mais frequentemente uma expressão superior a 10% do que nos casos em que o gene mutado era o *MLH1* [9/14 (64%) vs 6/18 (33%)], apesar de a diferença não ser estatisticamente significativa ($p=0,06$). A elevada expressão de caspase 3 nos tumores de SL associados a mutação germinal no *MSH2* poderá estar relacionada com uma tendência para estes tumores apresentarem elevada infiltração linfocítica e reacção inflamatória do tipo *Crohn-Like* [6/11 (55%) e 7/16 (44%), respectivamente] em relação aos tumores de SL associados a mutação germinal no *MLH1* [4/12 (33%) e 21/4

(19%), respectivamente]. A maior prevalência de infiltração linfocítica e de reacção *Crohn-Like* nos tumores de SL associados a mutação germinal no *MSH2* na presente série de tumores é confirmada por estudos anteriores [67]. Deste modo, a maior expressão de caspase 3 nos tumores de SL deverá ser atribuída principalmente aos tumores associados a mutação germinal no *MSH2* e não aos tumores associados a mutação no *MLH1*, os quais se assemelham aos tumores esporádicos MSS. Este facto, é apoiado por estudos anteriores que mostraram que células deficientes no gene *MLH1* eram mais resistentes à indução de apoptose por alguns agentes terapêuticos, quando comparadas com outras deficientes em *MSH2*, o que pode indicar uma maior expressão de caspase 3 nos últimos [68]. Adicionalmente, também foi descrito que tumores do urotélio, os quais são associados frequentemente a uma deficiente expressão da proteína MLH1, também apresentam uma baixa expressão de caspase 3 [69].

Desta forma, será também importante avaliar se os tumores associados a mutação germinal no *MSH2*, devido à maior expressão de caspase 3, poderão apresentar uma maior sensibilidade à terapêutica com 5-FU em relação aos associados a mutação germinal no *MLH1*.

4.1.3. Expressão da caspase 8

No geral, ao contrário do que se verificou na caspase 3, a maioria dos tumores apresentaram uma expressão de caspase 8 em mais de 10% das células do tumor, a que se verificou principalmente nos tumores com MSI. De acordo, verificou-se que a expressão de caspase 8 foi significativamente superior nos tumores esporádicos MSI em relação aos MSS [expressão em mais de 10% das células em 11/13 (85%) vs 9/21 (43%), $p=0,01$]. Em relação à expressão de caspase 8 apenas se encontra descrito que esta aumenta com o desenvolvimento tumoral (ou seja de mucosa normal para adenoma e finalmente para carcinoma) [47].

De salientar que, ao contrário do verificado para a caspase 3, a expressão de caspase 8 foi significativamente superior nos tumores associados a mutação germinal no *MLH1* em relação aos tumores associados a mutação germinal no *MSH2* [expressão em mais de 10% das células em, 14/18 (78%) vs 6/14 (43%), respectivamente, $p=0,04$]. Esta associação de uma maior expressão de caspase 8 associada à deficiência de *MLH1* é reforçada pela percentagem elevada de tumores esporádicos MSI com expressão superior a 10% (85%), os quais, na sua maioria, apresentam deficiência do sistema MMR devido à hipermetilação do promotor do gene *MLH1*.

Tendo em conta a importância de uma elevada expressão de caspase 8 para a sensibilidade das células tumorais a terapêuticas com base no TRAIL ou outros agentes terapêuticos que actuem essencialmente através da activação da caspase 8, será de interesse estudar se os tumores deficientes em *MLH1* terão uma maior tendência para responderem a estas terapêuticas [47, 70].

4.1.4. Associação entre a expressão das proteínas caspase 3, caspase 8 e p21

Na maioria dos tumores não se verificou qualquer associação entre a expressão das proteínas caspase 3, caspase 8 e p21. No entanto, nos tumores de SL verificou-se que os casos que apresentavam uma baixa expressão de p21 apresentavam também uma reduzida expressão de caspase 3 ($p=0,03$) (tabela 5). Separando os tumores associados a mutação germinal no gene *MLH1* e os tumores associados a mutação germinal no gene *MSH2*, verificou-se que no primeiro caso todos os tumores com expressão de p21 numa percentagem inferior a 10% das células também apresentavam uma expressão de caspase 3 inferior a 10%. De facto todos os tumores com baixa expressão destas duas proteínas encontravam-se associados a mutação germinal no gene *MLH1* (6/6; 100%), o que não aconteceu nos casos com expressão de p21 igual ou superior a 10% (6/12; 50%) ($p=0,004$). Cinco dos seis casos com reduzida expressão de p21 e caspase-3 apresentavam mutação no gene *CTNNB1*, o que em determinados contextos celulares pode originar uma forte activação da via WNT e conduzir a apoptose [71]. Como foi referido anteriormente, níveis elevados de sinalização nesta via, originam uma elevada expressão de *MYC* que por sua vez inibe o *p21* e pode justificar a reduzida expressão da proteína p21 nestes casos. A baixa expressão de caspase 3 pode ser um modo de o tumor escapar à apoptose.

Expressão	Expressão da caspase 3 por imunohistoquímica					
	S. Lynch (<i>MLH1</i> & <i>MSH2</i>)		S. Lynch <i>MLH1</i>		S. Lynch <i>MSH2</i>	
	<10%	≥10%	<10 %	≥10%	<10%	≥10%
p21 <10%	7/8 (88%) ^a	1/8 (12%) ^a	6/6 (100%) ^b	0/6 (0%) ^b	0/1 (0%)	1/1 (100%)
p21 ≥ 10%	11/25 (44%) ^a	14/25 (56%) ^a	6/12 (50%) ^b	6/12 (50%) ^b	5/13 (38%)	8/13 (62%)

Tabela 5 – Correlação entre a expressão de caspase 3 e de p21 em tumores de síndrome de Lynch (SL)

Legenda: a) $p=0,03$; b) $p=0,004$.

4.2. Relação entre a expressão das proteínas p21, caspase 3 e caspase 8 e as mutações nos genes *APC*, *CTNNB1*, *TCF7L2* e *KRAS*

No grupo de tumores esporádicos MSS, MSI ou mesmo nos tumores HNPCC não se verificou qualquer relação entre a expressão das proteínas em estudo neste

trabalho e as mutações em genes específicos das vias WNT e RAS/RAF (anexo XI). Relativamente aos tumores de SL verificou-se que existia uma correlação entre a expressão de p21 e as mutações no gene *CTNNB1*, ou seja, os tumores que possuem mutação no gene *CTNNB1* apresentam mais frequentemente uma expressão de p21 inferior a 10% do que os sem mutação neste gene [6/8 (75%) vs. 2/25 (8%), $p=0,0006$] (tabela 6). Como já foi referido, este facto poderá ser devido à sobre-expressão do *MYC*, o que resulta na consequente inibição do *p21* tal como foi demonstrado em estudos prévios [35, 65].

		Expressão por imunohistoquímica					
		p21		Caspase 3		Caspase 8	
Mutaçào		<10%	≥10%	<10%	≥10%	>10%	≥10%
SL	<i>CTNNB1</i> + (8)	6 (75%) ^a	2 (25%) ^a	5 (63%)	3 (37%)	4 (50%)	4 (50%)
	<i>CTNNB1</i> - (25)	2 (8%) ^a	23 (92%) ^a	13 (52%)	12 (48%)	9 (36%)	16 (64%)
	<i>TCF7L2</i> + (19)	8 (42%) ^b	11 (58%) ^b	12 (63%)	7 (37%)	7 (37%)	12 (63%)
	<i>TCF7L2</i> - (13)	0 (0%) ^b	13 (100%) ^b	5 (38%)	8 (62%)	5 (38%)	8 (62%)
	<i>KRAS</i> + (12)	3 (25%)	9 (75%)	5 (42%)	7 (58%)	0 (0%) ^c	12 (100%) ^c
	<i>KRAS</i> - (23)	8 (35%)	15 (65%)	14 (61%)	9 (39%)	12 (52%) ^c	11 (48%) ^c

Tabela 6 – Correlação entre a expressão das proteínas p21, caspase 3 e 8 e as mutações nos genes *CTNNB1*, *TCF7L2* e *KRAS* em tumores de síndrome de Lynch (SL).

Legenda: a) $p=0,0006$; b) $p=0,007$; c) $p=0,001$; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação.

Uma situação semelhante à do gene *CTNNB1* verifica-se com as mutações no gene *TCF7L2*. Os tumores de SL com mutação neste gene apresentam também mais frequentemente uma expressão mais baixa de p21 (inferior a 10%) que os sem mutação [8/19 (42%) vs. 0/13, $p=0,007$]. É de realçar que a maioria dos tumores que possuem expressão de p21 inferior a 10% têm mutação nos genes *CTNNB1* e *TCF7L2*. Foi recentemente demonstrado que o gene *TCF7L2* desempenha um papel de repressor na regulação da transcrição mediada pela via WNT [72]. Conhecendo a associação de níveis elevados de p21 ao melhor prognóstico dos tumores, isto poderá implicar que os tumores de SL com mutação nestes dois genes poderão apresentar um pior prognóstico.

Nos tumores de SL, verifica-se ainda uma correlação entre a expressão da caspase 8 e as mutações no gene *KRAS*, ou seja, quando o gene *KRAS* se encontra mutado existe mais frequentemente uma expressão de caspase 8 superior a 10 % do quando este não apresenta mutações [12/12 (100%) vs 11/23 (48%), $p=0,001$]. Isto pode dever-se ao facto de o gene *KRAS* mutado ter a capacidade de regular a expressão de receptores indutores de apoptose, nomeadamente o TRAIL-R1 (DR 4) e

TRAIL-R2 (DR5), os quais induzem apoptose pela via mediada pela caspase 8. O TRAIL é considerado uma “arma” muito promissora no combate ao cancro, devido a sua capacidade de induzir apoptose selectiva das células tumorais [73, 74], desta forma as mutações no KRAS em síndrome de Lynch poderiam ser utilizadas como possível indicador de resposta à terapêutica com TRAIL.

4.3. Expressão das proteínas p21, caspases 3 e 8 e mutações em genes específicos das vias WNT e RAS/RAF: correlação com a sobrevivência com ou sem terapêutica

4.3.1. Tumores MSI

Neste trabalho foi avaliado se a expressão das proteínas p21, caspases 3 e 8 e as mutações em genes específicos das vias WNT e RAS/RAF em diferentes grupos de doentes, submetidos ou não a terapêutica adjuvante com base no 5-FU (a mais utilizada no CCR), poderão constituir factores preditivos de prognóstico. Uma vez que a grande maioria dos doentes com tumores MSI não é submetido a terapêutica porque como já foi referido não apresentam em geral benefícios, a correlação com a sobrevivência no subgrupo MSI foi efectuada apenas nos doentes não submetidos a terapêutica.

Assim, nos doentes com CCR com MSI que não foram submetidos a quimioterapia adjuvante não se verificou qualquer associação entre a expressão de cada uma das proteínas p21, caspases 3 e 8 e a sobrevivência. No entanto, se a expressão das mesmas for analisada em conjunto, verifica-se que os doentes cujos tumores apresentam uma elevada expressão de p21 e uma baixa expressão das caspases 3 e 8 tendem a apresentar um melhor prognóstico ($p=0,03$ num total de 26 doentes), apesar do pequeno número de casos representados em cada combinação das três proteínas. Nestes casos, uma elevada expressão de p21 tem a capacidade de regular e induzir a paragem do ciclo celular através da sua interacção com os complexos ciclina/CDK [32]. Esta capacidade do p21 inibir a proliferação celular poderá assim contribuir para a sua função de supressor tumoral e consequentemente para o melhor prognóstico dos tumores MSI.

No mesmo grupo de doentes avaliou-se ainda a existência de uma associação entre as mutações em genes específicos das vias WNT e RAS/RAF, nomeadamente, *CTNNB1*, *APC*, *TCF7L2* e *KRAS*, e a sobrevivência. No caso dos genes *KRAS*, *CTNNB1* e *APC* não se observou qualquer associação entre a presença de mutações e o prognóstico dos doentes. Verificou-se que as mutações no *TCF7L2* parecem associar-se a um mau prognóstico ($p=0,06$ num total de 25 doentes) (gráfico 1).

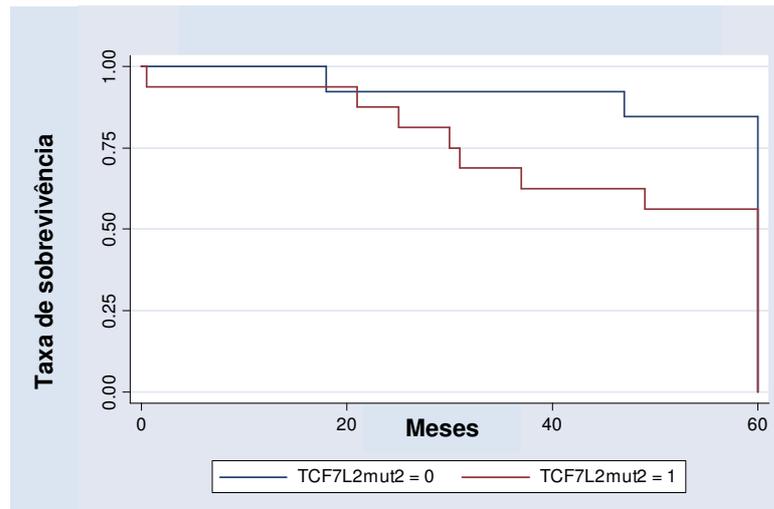


Gráfico 1 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre o estado mutacional do gene *TCF7L2* e a sobrevivência em CCR com MSI na ausência de terapêutica. Doentes com o gene *TCF7L2* mutado apresentam uma tendência para um pior prognóstico ($p=0,06$).

Legenda: TCF7L2mut2=0 → gene *TCF7L2* normal; TCF7L2mut2=1 → gene *TCF7L2* mutado.

No entanto, avaliando esta associação apenas nos doentes sem metástases, uma vez que a presença destas poderá implicar que mesmo na ausência de mutações a sobrevivência seja menor, verificou-se que as mutações no *TCF7L2* se associam significativamente a um mau prognóstico ($p=0,02$, num total de 21 doentes) (gráfico 2).

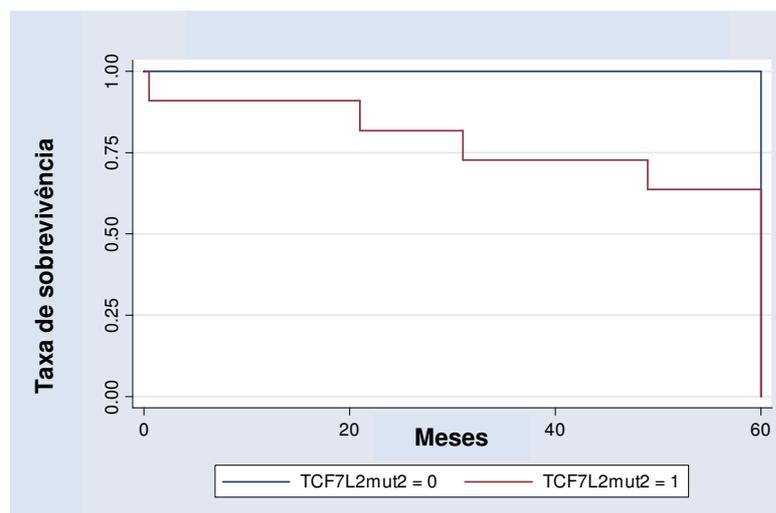


Gráfico 2 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre o estado mutacional do gene *TCF7L2* e a sobrevivência em CCR com MSI na ausência de terapêutica, em doentes sem metástases. Doentes com o gene *TCF7L2* mutado possuem pior prognóstico ($p=0,02$).

Legenda: TCF7L2mut2=0 → gene *TCF7L2* normal; TCF7L2mut2=1 → gene *TCF7L2* mutado.

Devido ao gene *TCF7L2* actuar como repressor dos genes alvo e os casos em estudo serem principalmente tumores MSI com mutações no gene *TCF7L2*, desta

forma estas mutações poderão ser responsáveis pela activação de determinados genes alvo, envolvidos na invasão celular ou na metastização. Este facto poderá explicar a associação entre os doentes com gene *TCF7L2* mutado e um mau prognóstico [72, 75]. Adicionalmente, nestes doentes com tumores MSI que não foram sujeitos a quimioterapia, verificou-se uma maior sobrevivência dos doentes que apresentavam o gene *TCF7L2* normal e elevada expressão da caspase 3 ($p=0,01$, num total de 23 doentes). Com o mesmo tipo de associação mas em doentes sem metástases esta associação ainda foi mais significativa ($p=0,0002$, num total de 20 doentes). Desta forma pode-se sugerir que as mutações no *TCF7L2*, ou a combinação destas com a expressão de caspase 3, possam vir a representar factores preditivos de prognóstico em doentes com CCR MSI (esporádico ou SL), especialmente numa fase precoce antes do desenvolvimento de metástases, o que poderá ser importante para o seu manejo clínico.

4.3.2 Tumores esporádicos MSS

Uma vez que tal como o descrito anteriormente por vários estudos, a maioria dos doentes com tumores MSS é submetido a terapêutica, a correlação com a sobrevivência no subgrupo MSS foi efectuada apenas nos doentes submetidos a terapêutica adjuvante com base no 5-FU.

Nos doentes com CCR esporádico MSS submetidos a quimioterapia, quer adjuvante (após cirurgia) quer paliativa (antes da cirurgia), verificou-se uma associação significativa entre uma reduzida expressão de p21 no tumor e uma maior sobrevivência ($p=0,009$, num total de 23 doentes) (gráfico 3). Isto poderá dever-se ao facto já mencionado na introdução deste trabalho, de o p21 aumentar a expressão de TS, assim, quando existe baixa expressão de p21 vai existir conseqüentemente uma baixa expressão de TS. É de realçar que os tumores do cólon com MSI possuem uma elevada expressão de TS em comparação com os tumores MSS, o que poderá estar associado à sua maior resistência à terapêutica. Portanto os tumores esporádicos MSS que possuem uma reduzida expressão de p21 e, conseqüentemente, de TS ficam desta forma mais sensíveis ao 5-FU, podendo assim existir uma melhor resposta a terapêutica [50, 51]. Por outro lado, a elevada expressão de p21 e a sua capacidade de se ligar à pro-caspase 3 bloqueando a activação da caspase 3, poderá também levar à resistência das células à apoptose e contribuir para o pior prognóstico destes tumores na presença de quimioterapia [36, 76].

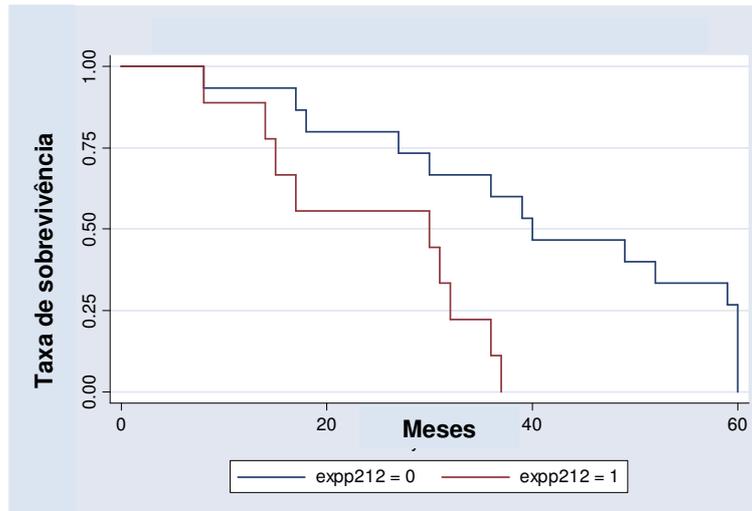


Gráfico 3 – Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre a expressão de p21 e a sobrevivência em CCR MSS, em doentes submetidos a terapêutica.

Doentes com expressão de p21 em <10% das células tumorais possuem melhor prognóstico ($p=0,004$).

Legenda: exp212=0 → expressão de p21 em <10% das células tumorais; exp212=1 → expressão de p21 em $\geq 10\%$ das células tumorais.

No mesmo grupo de doentes mas apenas nos submetidos a terapêutica paliativa, ou seja, em que o estudo da expressão foi posterior ao tratamento, verificou-se uma maior sobrevivência a 5 anos nos doentes cujos tumores apresentaram uma maior expressão de caspase 3 ($p=0,02$, num total de 12 doentes) (gráfico 4).

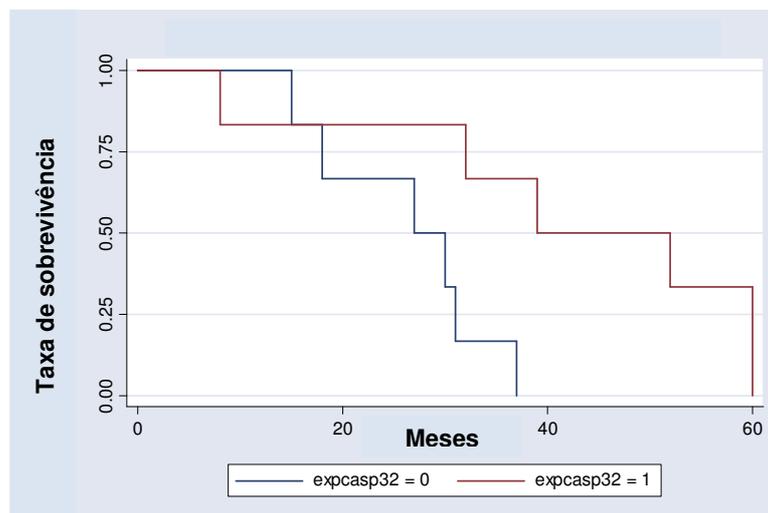


Gráfico 4 - Curvas de sobrevivência de acordo com o método Kaplan-Meier que traduzem a correlação entre a expressão de caspase 3 e a sobrevivência em CCR MSS, em doentes submetidos a terapêutica paliativa.

Doentes com expressão de caspase 3 em $\geq 10\%$ das células tumorais possuem melhor prognóstico ($p=0,02$).

Legenda: expcasp32=0 → expressão de caspase 3 em <10% das células tumorais; expcasp32=1 → expressão de caspase 3 em $\geq 10\%$ das células tumorais.

Uma vez que estes doentes já tinham feito terapêutica baseada no 5-FU, a qual actua induzindo a apoptose, os doentes com maior expressão desta proteína apresentarão um maior nível de apoptose, o que é contrário ao desenvolvimento do tumor e por isso associa-se a um melhor prognóstico. Deste modo, a expressão de caspase 3 pode aparentemente ser utilizada como um marcador de resposta à terapêutica com 5-FU nestes doentes.

No mesmo grupo de tumores não se verificou nenhuma correlação estatisticamente significativa entre a expressão da caspase 8, *KRAS* e *APC* e a sobrevivência.

5. Conclusão

O CCR deve-se ao desequilíbrio dos processos de diferenciação, proliferação e apoptose. Este estudo permitiu obter algumas associações entre a expressão de p21, caspase 3 e 8 e mutações em genes envolvidos nas vias WNT e RAS/RAF, envolvidos nestes processos, e consequentemente estabelecer algumas correlações com o prognóstico e resposta à terapêutica.

Verificou-se que uma expressão elevada de p21, caspase 3 e 8 era em geral mais frequente nos tumores MSI quando comparado com os tumores esporádicos MSS, no entanto enquanto no caso do p21 este facto parece generalizar-se à MSI, no caso das caspases o mesmo não acontece. A maior expressão de caspase 3 poderá estar relacionada com a mutação germinal no *MSH2* no doente e à maior frequência de infiltrado linfocitário e de reacção inflamatória do tipo *Crohn-like* nestes tumores. A maior expressão de caspase 8, parece estar associada à deficiência no gene *MLH1*, uma vez que não se verifica apenas em síndrome de Lynch associado à mutação germinal no *MLH1* mas também nos tumores esporádicos MSI que apresentam na sua maioria hipermetilação do promotor do *MLH1*. Ainda no síndrome de Lynch, as mutações somáticas nos genes *CTNNB1* e *TCF7L2* associaram-se à menor expressão de p21 e de caspase 3, enquanto as mutações, no *KRAS*, se relacionaram com uma maior expressão de caspase 8.

Em termos de relação com a sobrevivência, nos tumores com MSI, verificou-se que as mutações no *TCF7L2* se associavam a um mau prognóstico, sobretudo se esta avaliação incluir apenas doentes numa fase mais precoce da doença, sem apresentarem metástases. O facto de as mutações neste gene poderem levar à activação de genes alvo envolvidos na invasão e metastização poderá suportar o seu envolvimento nesta fase de progressão da doença e sugerir que possa ser utilizado como factor preditivo de prognóstico neste tipo de tumores. Adicionalmente, verificou-se que a utilização das mutações neste gene como marcador de mau prognóstico se tornava ainda mais significativa, se associada à elevada expressão de caspase 3. Por outro lado, uma baixa expressão das caspases 3 e 8 e uma elevada expressão de p21 em conjunto parecem associadas a um melhor prognóstico nos tumores MSI. Estes factos poderão ser importantes no manejo clínico de doentes com este tipo de tumores e deverão ser confirmados num maior número de doentes.

No que diz respeito aos doentes que apresentam tumores MSS, submetidos a terapêutica, quer adjuvante quer paliativa, verificou-se uma associação significativa entre uma reduzida expressão de p21 no tumor e uma maior sobrevivência, o que está de acordo com uma reduzida expressão da enzima timidilato sintetase nestes tumores,

que é uma das causas da resistência à terapêutica baseada no 5-FU. Por outro lado a ausência de efeito inibidor do p21 sobre a caspase 3 conduz ao aumento da apoptose, o que é favorável à resposta do tumor e ao prognóstico. No caso específico dos doentes submetidos a terapêutica paliativa, ou seja, em que o estudo da expressão foi posterior ao tratamento, verificou-se uma maior sobrevivência nos doentes cujos tumores apresentaram uma maior expressão de caspase 3 em resposta ao 5-FU. Deste modo, a expressão de caspase 3 pode aparentemente ser utilizada como um marcador de resposta à terapêutica nestes doentes.

Em resumo, o facto de os doentes terem sido estratificados de acordo com a presença ou ausência instabilidade de microssatélites no tumor, levou a que, neste estudo, apesar do número não muito elevado de doentes por grupo, se melhorasse o conhecimento em relação à expressão de p21 e caspases 3 e 8 em diferentes tipos de CCR. Mais importante, esta estratificação contribuiu ainda para confirmar algumas correlações já sugeridas na literatura. Neste âmbito é de salientar que uma expressão reduzida de p21 parece ser um marcador preditivo de bom prognóstico e que uma expressão aumentada de caspase 3 após quimioterapia paliativa parece ser um indicador de resposta à terapêutica, associando-se a uma maior sobrevivência. Adicionalmente, a relação entre a deficiência em *MSH2* e a maior expressão de caspase 3 e entre a deficiência em *MLH1* e a maior expressão de caspase 8, poderá ajudar futuramente na definição da terapêutica a utilizar, 5-FU ou TRAIL, respectivamente. Por outro lado, em doentes com tumores MSI, não submetidos a terapêutica, este estudo permite sugerir pela primeira vez que as mutações no gene *TCF7L2*, ou em associação com a elevada expressão de caspase 3, possam constituir factores preditivos de mau prognóstico. Será pois importante estender este estudo a um maior número de doentes de modo a confirmar todas as associações observadas em relação ao prognóstico e à terapêutica no CCR.

6. Bibliografia

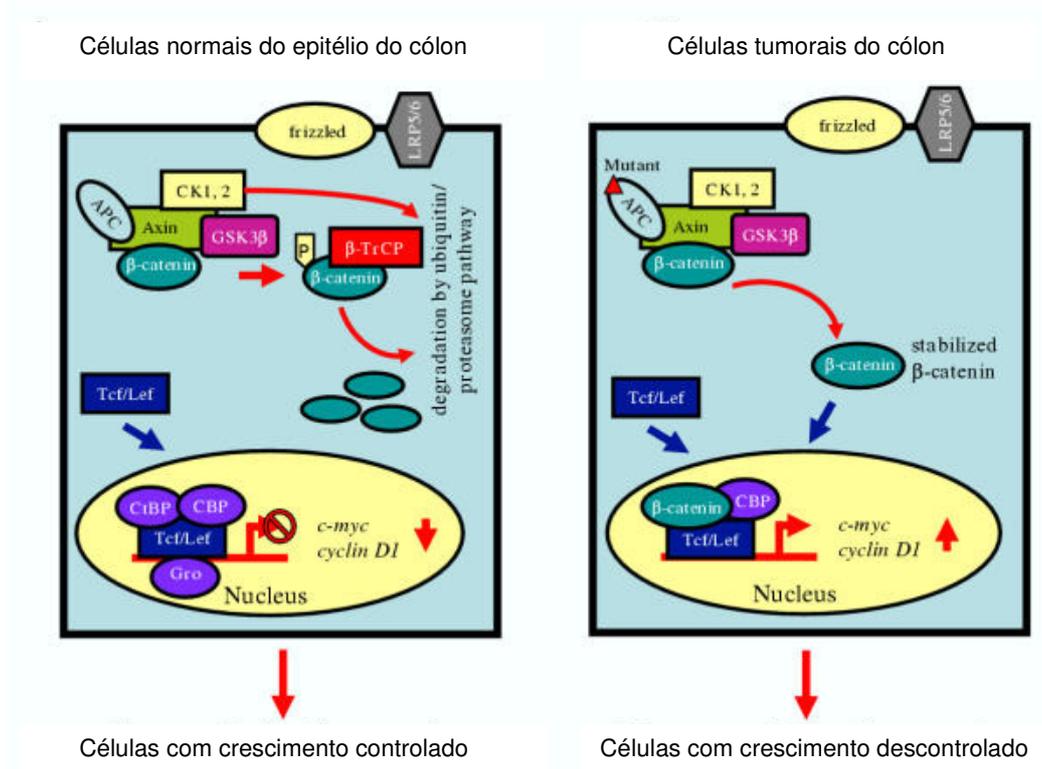
- 1 - Bingham, S.; Riboli, E. (2004). *Diet and cancer — the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition*. Nature Reviews Cancer. 4:206-215.
- 2 - Pinheiro, P.S.; Tyczynski, J.E.; Bray, F.; Amado, J.; Matos, E.; Parkin, D.M.; (2003). *Cancer incidence and mortality in Portugal*. Eur J Cancer; 39:2507-2520.
- 3 - Wijnen J.T.; (1999). *Molecular Genetics of Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*. University of Leiden, Netherlands.
- 4 - Van Der Luijt, R.B.; (1996). *Molecular Basis of Phenotypic Variability in Familial Adenomatous Polyposis*. University of Leiden, Netherlands.
- 5 - Kinzler, K.W.; Vogelstein, B.; (1996). *Lessons from Hereditary Colorectal Cancer*. Cell. 87:159-170.
- 6 - Nobre Leitão C.; (1993). *Carcinogénese do Cólon e Recto, Contribuição Clínica e Experimental*. Lisboa
- 7 - Lynch, H.T.; Chapelle A.; (2003). *Hereditary Colorectal Cancer*. N. Engl. J. Med., 348:919-932.
- 8 - Lynch, H.T.; Smyrk, T.C.; (1998). *Classification of familial adenomatous polyposis: a diagnostic nightmare*. Am J Hum Genet. 62(6):1288-9.
- 9 - Lynch, H.T.; Chapelle, A.; (1999). *Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer*. J Med Genet. 36(11): 801-18.
- 10 - Narayan, S.; Roy, D.; (2003). *Role of APC and DNA Mismatch Repair Genes in the Development of Colorectal Cancers*. Mol. Cancer, 2:41.
- 11 - Ilyas, M.; Straub, J.; Tomlinson, I.P.M.; Bodmer, W.F.; (1999). *Genetic Pathways in Colorectal and other Cancers*. Eur. J. Cancer, 35:335-351.
- 12 - Chung D.C.; (2000). *The Genetic Basis of Colorectal Cancer: Insights into Critical Pathways of Tumorigenesis*. Gastroenterology, 119:854-865.
- 13 - Fodde, R.; Smits, R.; Clevers, H.; (2001). *APC, Signal transduction and genetic instability in colorectal cancer*. Nature review cancer. 1:55-67.
- 14 - Fodde, R.; (2002). *The APC gene in colorectal cancer*. European Journal of Cancer. 867-871.
- 15 - Fearhead, N.; Britton, MP.; Bodmer, WF.; (2001). *The ABC of APC*. Human Molecular Genetics. 10:7 721-733.
- 16 - Thibodeau, S.N.; Bren, G.; Schaid, D.; (1993). *Microsatellite instability in cancer of proximal colon*. Science. 260: 816-891.
- 17 - Hadjihannas, M.V.; Behrens, J.; (2006). *CIN by WNT*. Cell Cycle. 5(18):2077-2081.
- 18 - Cohen, M.; (2003). *Molecular dimensions of gastrointestinal tumors: some thoughts for digestion*. American Journal of Medical genetics. 122A:303-314.
- 19 - Stoler, D.; Chen, N.; Basik, M.; Kahlenberg, M.; Rodriguez-Bigas, M.; Petrelli, N.; Anderson, G.; (1999). *The onset and extent of genomic instability in sporadic colorectal tumor progression*. PNAS. 15121-15126.
- 20 - Lynch, H.T.; Smyrk, T.; Lynch, J.; (1997). *An update of HNPCC (Lynch syndrome)*. Cancer Genet Cytogenet. 84-99.
- 21 - Chung, D.; Rustgi, A.; (1995). *DNA mismatch repair and cancer*. Gastroenterology. 109:1685-1699.
- 22 - Peltomaki, P.; (2001). *Deficient DNA mismatch repair: a common etiologic factor for colon cancer*. Human Molecular Genetic. 10(7):735-740.
- 23 - Wheeler, J.; Bodmer, W.; (2000). *DNA mismatch repair genes and colorectal cancer*. Gut. 47:148-153.
- 24 - Zomig, M.; Hueber, AO.; Baum, W.; Evan, G.; (2001). *Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis*. Biochim Biophys Acta. 1551:F1-F37.
- 25 - Weinberg, WC.; Denning MF.; (2002). *P21^{Waf1} control of epithelial cell cycle and cell fate*. Crit. Rev. Oral Biol. Med. 13(6):453-464.
- 26 - Fodde, R.; (2003). *The multiple functions of tumour suppressors: it's all in APC*. Nature Cell Biology. 5(3):190-192.
- 27 - Kolch, W.; (2000). *Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions*. Biochemical Journal. 351:289-305.
- 28 - Rubio, I.; Downward, J.; (2002). *Ras activation revisited*. Signal Transduction. 11-24.
- 29 - Downward, J.; (2003). *Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy*. Nature Reviews Cancer. 3:11-22.
- 30 - Malumbres, M.; Barbacid, M.; (2003). *RAS oncogenes: the first 30 years*. Nature Reviews Cancer. 3: 459-465.
- 31 - Gartel, AL.; Tyner, AL.; (2002). *The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis*. Molecular Cancer Therapeutics. 639-649.

- 32 - Sherr, C.J.; Roberts, J.M.; (1995). *Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases*. Genes Development. 9 (10):1149-1163.
- 33 - Poole, A.J.; Heap, D.; Carroll, R.; Tyner, A.L.; (2004). *Tumor suppressor functions for the Cdk inhibitor p21 in the mouse colon*. Oncogene. 23:8128-8134.
- 34 - Noda, H.; Maehara, Y.; Irie, K.; Kakeji, Y.; Yonemura, T.; Sugimachi, K.; (2002). *Increased proliferative activity caused by loss of p21 (WAF1/CIP1) expression and its clinical significance in patients with early-stage gastric carcinoma*. Cancer. 94(7): 2107-2112.
- 35 - Gartel, A.L.; Radhakrishnan, S.K.; (2005). *Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences*. Cancer Research. 65:3980-3985.
- 36 - Liu, S.; Bishop, W.R.; Liu, M.; (2003). *Differential effects of cell cycle regulatory protein p21(WAF1/Cip1) on apoptosis and sensitivity to cancer chemotherapy*. Drug Resist Updat. 6(4):183-195.
- 37 - Zhang, Y.; Fujita, N.; Tsuruo, T.; (1999). *Caspase-mediated cleavage of p21^{Waf1/Cip1} converts cancer cells from growth arrest to undergoing apoptosis*. Oncogene. 18(5):1131-1138.
- 38 - Park, J.A.; Kim, S.W.; Kim, S.I.; Lee, S.K.; (1998). *Caspase 3 specifically cleaves p21WAF1/Cip1 in the earlier stage of apoptosis in SK-HEP-1 human hepatoma cells*. Eur. J. Biochemical. 257(1):242-248.
- 39 - Huerta, S.; Goulet, E.J.; Livingston, E.H.; (2006). *Colon cancer and apoptosis*. The American Journal of Surgery. 517-526.
- 40 - Huerta, S.; Goulet, E.J.; Huerta-Yepez, S.; (2007). *Screening and detection of apoptosis*. Journal of Surgical Research. 139:143-156.
- 41 - Hector, S.; Prehn, J.H.M.; (2009). *Apoptosis signaling proteins as prognostic biomarkers in colorectal cancer: a review*. Biochimica et Biophysica Acta. 117-129.
- 42 - Walther, A.; Johnstone, E.; Swanton, C.; Midgley, R.; Tomlinson, I.; Kerr, D.; (2009). *Genetic prognostic and predictive markers in colorectal cancer*. Nature Reviews. 9:489-499.
- 43 - Edmonston, T.B.; Cuesta, K.H.; Burkholder, S.; Barusevicius, A.; Rose, D.; Kovatich, A.J.; Boman, B.; Fry, R.; Fishel, R.; Palazzo, J.P.; (2000). *Colorectal carcinomas with high microsatellite instability: defining a distinct immunologic and molecular entity with respect to prognostic markers*. Human Pathology. 31(12):1506-1514.
- 44 - Zlobec, I.; Baker, K.; Terracciano, L.M.; Lugli, A.; (2008). *RHAMM, p21 combined phenotype identifies microsatellite instability-high colorectal cancers with a highly adverse prognosis*. Clin. Cancer Res. 14(12):3798-806.
- 45 - Jonges, L.E.; Nagelkerke, J.F.; Ensink, N.G.; Van der Velde, E.A.; Tollenaar, R.A.; Fleuren, G.J.; Van de Velde, C.J.; Morreau, H.; Kuppen, P.J.; (2001). *Caspase-3 activity as a prognostic factor in colorectal carcinoma*. Lab. Invest. 81(5):681-8.
- 46 - Xu, B.; Zhou, Z.G.; Li, Y.; Wang, L.; Yang, L.; Zhou, B.; Liu, H.Y.; Song, J.M.; Zeng, Y.J.; Wang, R.; Shen, X.G.; Sun, X.F.; (2008). *Clinicopathological significance of caspase-8 and caspase-10 expression in rectal cancer*. Oncology. 74:229-236.
- 47 - Heijink, D.M.; Kleibeuker, J.H.; Jalving, M.; Boersma-van, W.; Koornstra, J.J.; Wesseling, J.; Jong, S.; (2007). *Independent induction of caspase-8 and cFLIP expression during colorectal carcinogenesis in sporadic and HNPCC adenomas and carcinomas*. Cell Oncol. 29(5):409-19.
- 48 - Ribic, C.M.; Sargent, D.J.; Moore, M.J.; Thibodeau, S.N.; French, A.J.; Goldberg, R.M.; Hamilton, S.R.; Laurent-Puig, P.; Gryfe, R.; Shepherd, L.E.; Tu, D.; Redston, M.; Gallinger, S.; (2003). *Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer*. N. Engl. J. Med. 349(3):247-257.
- 49 - Matuo, R.; Sousa, F.G.; Escargueil, A.E.; Soares, D.G.; Grivicich, I.; Saffi, J.; Larsen, A.K.; Henriques, J.A.; (2009). *DNA repair pathways involved in repair of lesions by 5-FU its active metabolite FdUMP*. Biochem. Pharmacol. 79(2):147-153.
- 50 - Ricciardiello, L.; Ceccarelli, C.; Angiolini, G.; Pariali, M.; Chieco, P.; Paterini, P.; Biasco, G.; Martinelli, G.; Roda, E.; Bazzoli, F.; (2005). *High thymidylate synthase expression in colorectal cancer with microsatellite instability: implications for chemotherapeutic strategies*. Clin. Cancer Res. 11(11):4234-4240.
- 51 - Takagi, K.; Sowa, Y.; Cevik, O.M.; Nakanishi, R.; Sakai, T.; (2008). *CDK inhibitor enhances the sensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer cells*. Int. J. Oncol. 32(5):1105-1110.
- 52 - Geller, J.I.; Szekely-Szucs, K.; Petak, I.; Doyle, B.; Houghton, J.A.; (2004). *P21Cip1 is a critical mediator of the cytotoxic action of thymidylate synthase inhibitors in colorectal carcinoma cells*. Cancer Res. 64(17):6296-6303.
- 53 - Oca, J.; Azuara, D.; Sanchez-Santos, R.; Navarro, M.; Capella, G.; Moreno, V.; Sola, A.; Hotter, G.; Biondo, S.; Osorio, A.; Martí-Raqué, J.; Rafecas, A.; (2008). *Caspase-3 activity, response to chemotherapy and clinical outcome in patients with colon cancer*. int. J. Colorectal Dis. 23(1):21-27.

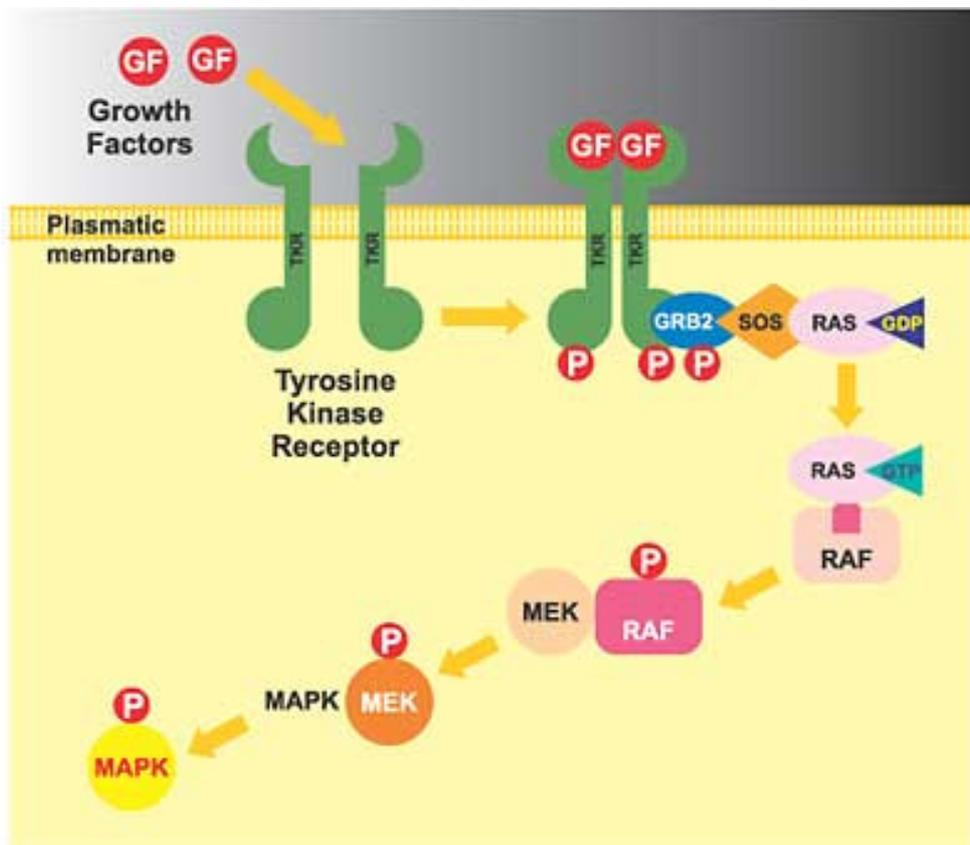
- 54 - Montero, C.; (2003). *The Antigen-Antibody Reaction in Immunohistochemistry*. The Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 51(1):1-4.
- 55 - Ramos-Vara, JA.; (2005). *Technical aspects of immunohistochemistry*. Vert. Pathol. 42:405-426.
- 56 - Cerio, R.; (1988). *Routine diagnostic immunohistochemical labeling of extracellular antigens in formal saline solution – fixed, paraffin-embedded cutaneous tissue*. Journal of the American Academy of Dermatology. 747-753.
- 57 - Voet, D.; Voet, J.; Pratt, C.; (1998). *Fundamentals of biochemistry*. New York: John Wiley & Sons, Inc.
- 58 - Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T.; (2nd Edition 1989). *Molecular cloning-A laboratory manual*. USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- 60 - Stansfield, W.; Colomé, J.; Cano, R.; (1998). *Biología Molecular e Celular*. McGraw-Hill.
- 61 - Videira, A.; (2001). *Engenharia Genética, princípios e aplicações*. Lisboa. LIDEL.
- 62 - Pinto, AE.; André, S.; Laranjeira, C.; Soares, J.; (2005). *Correlations of cell cycle regulators (p53, p21, pRb and mdm2) and c-erbB-2 with biological markers of proliferation and overall survival in breast cancer*. Pathology. 37(1):45-50.
- 63 - Kobayashil, T.; Masumoto, J.; Tada, T.; Nomiya, T.; Hongo, K.; Nakayama, J.; (2007). *Prognostic significance of the immunohistochemical staining of cleaved caspase-3, an activated form of caspase-3, in gliomas*. Clinical Cancer Research. 13(13):3868-3874.
- 64 - Shen, L.; Kondo, Y.; Hamilton, SR.; Rashid, A.; Issa, JP.; (2003). *P14 methylation in human colon cancer is associated with microsatellite instability and wild-type p53*. Gastroenterology. 124(3):626-633.
- 65 - Van de Wetering, M.; Sancho, E.; Verweij, C.; Lau, W.; Oving, I.; Hurlstone, A.; van der Horn, K.; Battle, E.; Coudreuse, D.; Haramis, AP.; Tjon-Pon-Fong, M.; Moerer, P.; Van den Born, M.; Soete, G.; Pals, S.; Eilers, M.; Medema, R.; Clevers, H.; (2002). *The beta-catenin/TCF-4 complex imposes a crypt progenitor phenotype on colorectal cancer cells*. Cell. 111(2):241-250.
- 66 - Løvig, T.; Meling, G.; Diep, CB.; Thorstensen, L.; Norheim, S.; Lothe, RA.; Rognum, TO.; (2002). *APC and CTNNB1 mutations in a large series of sporadic colorectal carcinomas stratified by the microsatellite instability status*. Scand J. Gastroenterology. 37(10):1184-1193.
- 67 - Shashidharan, M.; Smyrk, T.; Lin, KM.; Ternent, CA.; Thorson, AG.; Blatchford, GJ.; Christensen, MA.; Lynch, HT.; (1999). *Histologic comparison of hereditary nonpolyposis colorectal cancer associated with MSH2 and MLH1 and colorectal cancer from the general population*. Dis. Colon Rectum. 42(6):722-726.
- 68 - Wu, Q.; Vasquez, KM.; (2008). *Human MLH1 protein participates in genomic damage checkpoint signaling in response to DNA interstrand crosslinks, while MSH2 functions in DNA repair*. PLoS Genet. 4(9):e1000189.
- 69 - Lazaris, AC.; Zarogiannos, A.; Kavantzias, N.; Zervas, A.; Giannopoulos, A.; Nakopoulou, L.; (2006). *MLH1 mismatch repair gene product is associated with apoptotic potential of urothelial bladder carcinomas*. Anticancer Res. 26(2B):1535-1542.
- 70 - Kim, EJ.; Park, SY.; Shin, HK.; Kwon, DY.; Surh, YJ.; Park, JH.; (2007). *Activation of caspase-8 contributes to 3,3'-Diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells*. J. Nutr. 137(1):31-36.
- 71 - Kim, K.; Pang, KM.; Evans, M.; Hay, ED.; (2000). *Overexpression of beta-catenin induces apoptosis independent of its transactivation function with LEF-1 or the involvement of major G1 cell cycle regulators*. Molecular Biology of the Cell. 11:3509-3523.
- 72 - Tang, W.; Dodge, M.; Gundapaneni, D.; Michnoff, C.; Roth, M.; Lum, L.; (2008). *A genome-wide RNAi screen for Wnt/β-catenin pathway components identifies unexpected roles for TCF transcription factors in cancer*. PNAS. 105(28):9697-9702.
- 73 - Smakman, N.; Borel, IH.; Voest, EE.; Kranenburg, O.; *Control of colorectal metastasis formation by K-Ras*. Biochim. Biophys Acta. 1756(2):103-114.
- 74 - Oikonomou, E.; Kosmidou, V.; Katseli, A.; Kothonidis, K.; Mourtzoukou, D.; Kontogeorgos, G.; Andera, L.; Zografos, G.; Pintzas, A.; (2009). *TRAIL receptor upregulation and the implication of KRAS/BRAF mutations in human colon cancer tumors*. Int. J. Cancer. 125(9):2127-2135.
- 75 - Kolligs, FT.; Bommer, G.; Göke, B.; (2002). *Wnt/Beta-Catenin/Tcf Signaling: A Critical Pathway in Gastrointestinal Tumorigenesis*. International Journal of Gastroenterology. 66:131-144.
- 76 - Blundell, RA.; (2006). *The biology of p21Waf1/cip*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology. 2 (1): 33-40.
- 77 - Sorera, LA.; Castaner, J.; Bozzo, J.; Leeson, PA.; (2002). *Drugs of the future*. Prous Science. 27(12):1141.
- 78 - Satyanarayana, A.; Kaldis, P.; (2009). *A dual role of Cdk2 in DNA damage response*. Cell. Div. 4:9.
- 79 - Boatright, K.; Salvesen, G.; (2003). *Mechanisms of caspase activation*. Current Opinion in Cell Biology. 15:725-731.

7. Anexos

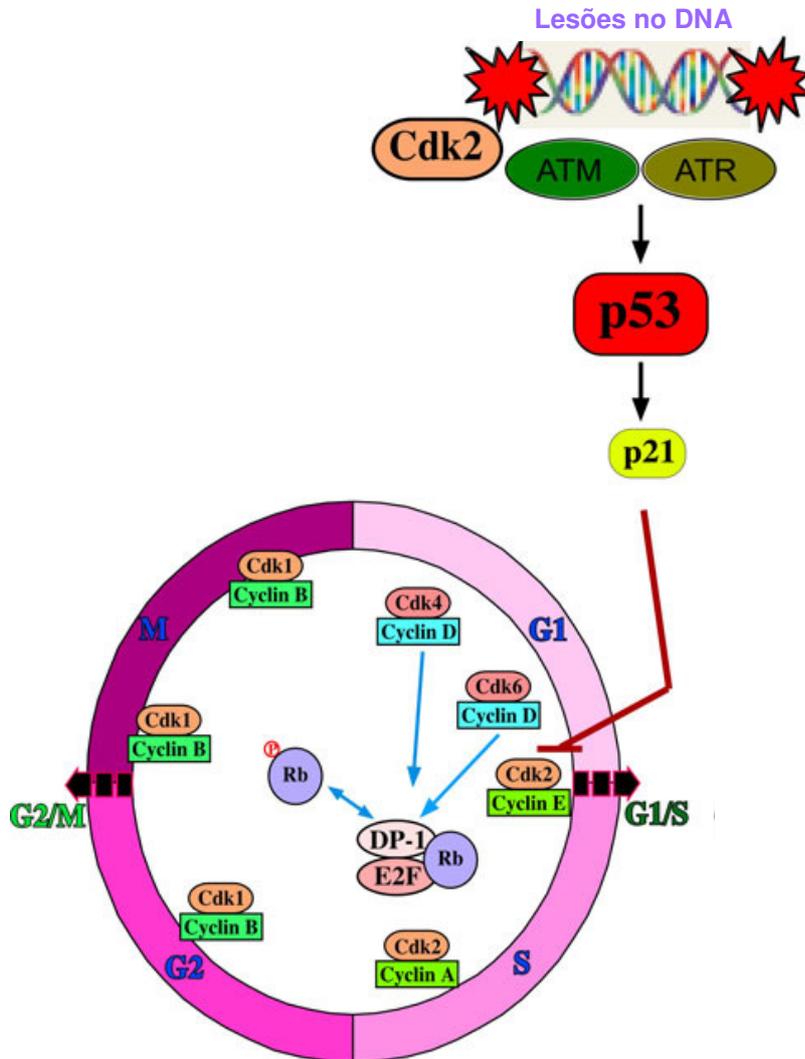
Anexo I - Via de sinalização WNT (fonte: adaptado [10]).



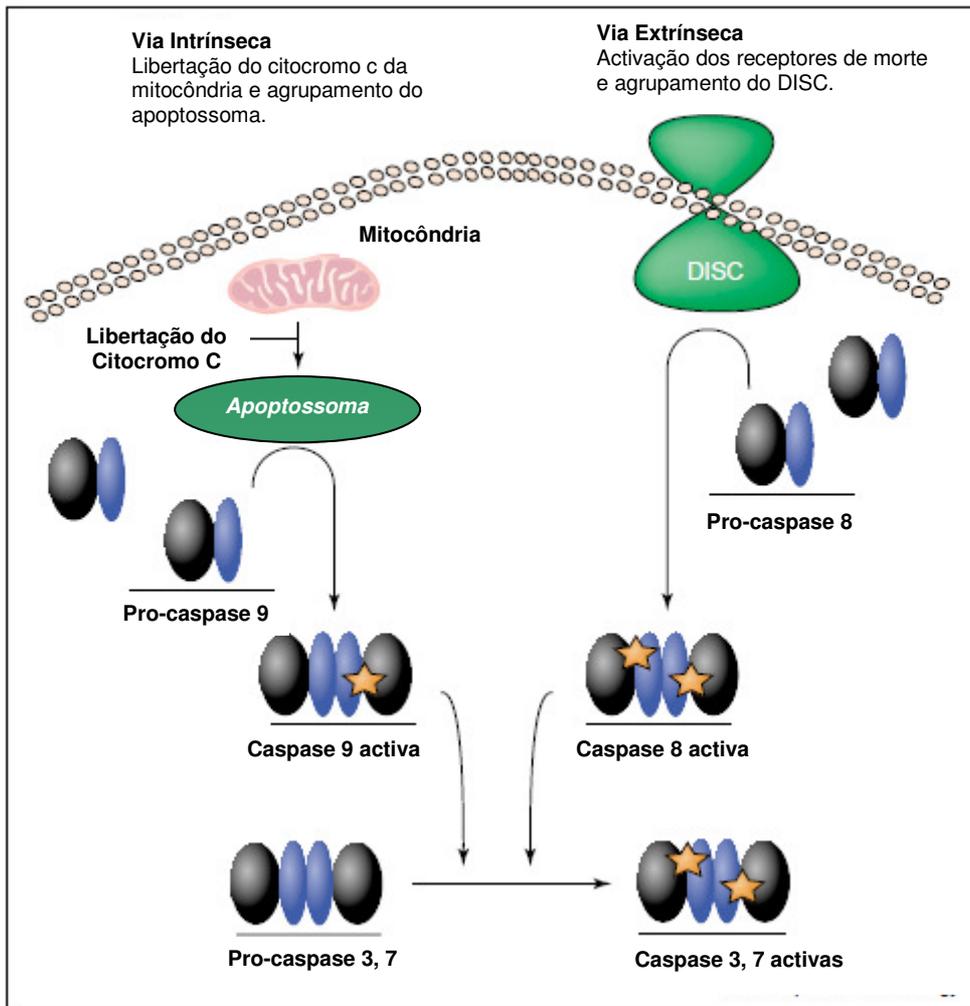
Anexo II - Via de sinalização RAS/RAF (fonte: [77]).



Anexo III - Activação da via p53-p21 em resposta a lesões no DNA (fonte: adaptado [78]).



Anexo IV - Via apoptótica das caspases (Fonte [79]).



Anexo V - Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do *APC* nos tumores de síndrome de Lynch.

Síndrome de Lynch							
Tumor	Histologia	Mut. Germinal	Mut. Somática		Expressão por imunohistoquímica		
			<i>APC</i>	<i>APC</i>	p21	Caspase 3	Caspase 8
439	ADC, MD	<i>MLH1</i>	+	<10%	<10%	<10%	> 95%
L184T3	ADC, PD	<i>MLH1</i>	-	50-75%	25-50%	<10%	50-75%
355	ADC, *	<i>MLH1</i>	+	<10%	10-25%	10-25%	75-95%
13	ADC, MD	<i>MLH1</i>	-	> 95%	50-75%	10-25%	> 95%
565	ADC, MD	<i>MLH1</i>	-	25-50%	25-50%	10-25%	> 95%
647	ADC, MD	<i>MLH1</i>	-	> 95%	<10%	<10%	> 95%
659P	ATDBG, *	<i>MLH1</i>	+	10-25%	25-50%	<10%	50-75%
L440P	ATDBG/AG, *	<i>MLH1</i>	-	25-50%	10-25%	<10%	25-50%
101	ADC, PD	<i>MLH1</i>	-	25-50%	<10%	<10%	<10%
811	ATDBG, *	<i>MLH1</i>	+	<10%	25-50%	<10%	25-50%
809	ADC, MD	<i>MLH1</i>	+	10-25%	<10%	<10%	50-75%
431	ADC, BD	<i>MLH1</i>	+	<10%	10-25%	<10%	50-75%
473	ADC, MD	<i>MLH1</i>	+	10-25%	10-25%	25-50%	50-75%
371	ADC, MD	<i>MLH1</i>	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
53	ADC, MD	<i>MLH1</i>	+	10-25 %	25-50%	10-25%	10-25%
429P1	ATDBG, *	<i>MLH1</i>	-	75-95%	10-25%	10-25%	<10 %
429P2	ATDBG, *	<i>MLH1</i>	+	<10%	<10%	<10%	<10%
579	ADC, BD	<i>MLH1</i>	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
393	ADC, MD	<i>MSH2</i>	+	<10%	10-25%	<10%	25-50%
280T1	ADC, PD	<i>MSH2</i>	-	25-50%	10-25%	10-25%	25-50%
507	ADC, PD	<i>MSH2</i>	-	50-75%	10-25%	<10%	50-75%
325	ADC, PD	<i>MSH2</i>	+	<10%	25-50%	25-50%	25-50%
207	ADC, PD	<i>MSH2</i>	+	<10%	50-75%	<10%	> 75%
711P	ATDBG, *	<i>MSH2</i>	+	<10%	25-50%	25-50%	<10%
L495T	ADC, MD	<i>MSH2</i>	+	10-25%	25-50%	10-25%	<10%
359	ADC, PD	<i>MSH2</i>	-	25-50%	10-25%	<10%	<10%
351A	ADC, *	<i>MSH2</i>	+	10-25%	<10%	10-25%	<10%
L397P	ADC, MD	<i>MSH2</i>	+	<10%	25-50%	<10%	10-25%
639	ADC, MD	<i>MSH2</i>	+	10-25%	10-25%	10-25%	<10%
595	ADC, BD	<i>MSH2</i>	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
587	ADC, PD	<i>MSH2</i>	+	<10%	10-25%	10-25%	10-25%
587	ADC, PD	<i>MSH2</i>	+	<10%	25-50%	<10%	10-25%
345	ADC, BD	<i>PMS2</i>	+	<10%	<10%	<10%	<10%

Legenda: ADC → Adenocarcinoma; ATDBG → Adenoma tubular com displasia de baixo grau; ATDAG → Adenoma tubular com displasia de alto grau; PD → Pouco diferenciado; MD → Moderadamente diferenciado; BD → Bem diferenciado; Mut. → Mutação; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação; * → Informação não disponível.

Continuação do anexo V

Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do *APC* nos tumores HNPCC MSS.

HNPCC MSS						
Tumor	Histologia	Mut. Somática	Expressão por imunohistoquímica			
		APC	APC	p21	Caspase 3	Caspase 8
369	ADC, MD	-	75-95%	25-50%	10-25%	25-50%
555	ADC, BD	-	50-75%	<10%	<10%	25-50%
785	ADC, BD	-	50-75%	25-50%	<10%	<10%
L447P	ATDBG, *	-	25-50%	25-50%	10-25%	10-25%
673P	ATDBG, *	+	<10%	75-95%	10-25%	<10%
741	ADC, MD	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
375P	ATDBG, *	+	<10%	<10%	10-25%	10-25%
479	ADC, *	+	<10%	<10%	<10%	<10%
519	ADC, MD	+	<10%	50-75%	10-25%	25-50%

Legenda: ADC → Adenocarcinoma; ATDBG → Adenoma tubular com displasia de baixo grau; MD → Moderadamente diferenciado; BD → Bem diferenciado; Mut. → Mutação; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação; * → Informação não disponível.

Continuação do anexo V

Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do *APC* nos tumores HNPCC MSI.

HNPCC MSI						
Tumor	Histologia	Mut. Somática	Expressão por imunohistoquímica			
		APC	APC	p21	Caspase 3	Caspase 8
449	ADC, MD	+	10-25%	<10%	10-25%	<10%
199	ADC, MD	+	<10%	<10%	10-25%	10-25%
787	ADC, MD	+	<10%	10-25%	<10%	10-25%
743A	DAG, *	+	<10%	25-50%	<10%	<10%
445	ADC, MD	+	<10%	<10%	25-50%	<10%
445	ADC, MD	-	> 95%	50-75%	<10%	75-95%
287T	ADC, PD	-	25-50%	10-25%	<10%	10-25%
287P1	ADC, *	-	50-75%	10-25%	10-25%	50-75%
287P2	ATDBG, *	-	25-50%	10-25%	10-25%	25-50%
539	ADC, MD	-	25-50%	10-25%	<10%	50-75%
463	ADC, PD	+	<10%	25-50%	<10%	<10%
357	ADC, *	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
205	ADC, PD	-	50-75%	10-25%	<10 %	10-25%
441	ADC, *	-	75-95%	10-25%	10-25%	25-50%
L721T	ADC, PD	+	<10 %	10-25%	25-50%	50-75%
701T	ADC, PD	+	<10%	25-50%	<10%	10-25%
719	ADC, MD	+	<10%	25-50%	<10%	<10%
L397P	ATDAG, *	-	75-95%	10-25%	10-25%	<10%

Legenda: ADC → Adenocarcinoma; ATDBG → Adenoma tubular com displasia de baixo grau; ATDAG → Adenoma tubular com displasia de alto grau; DAG → Displasia alto grau; PD → Pouco diferenciado; MD → Moderadamente diferenciado; Mut. → Mutação; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação; * → Informação não disponível.

Continuação do anexo V

Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do *APC* nos tumores esporádicos MSI.

Tumores esporádicos MSI						
Tumor	Histologia	Mut. Somática	Expressão por imunohistoquímica			
		<i>APC</i>	<i>APC</i>	p21	Caspase 3	Caspase 8
5	ADC, BD	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
45	ADC, BD	-	25-50%	<10%	10-25%	25-50%
97	ADC, PD	-	75-95%	<10%	10-25%	25-50%
139	ADC, BD	-	<10%	50-75%	<10%	50-75%
E425T	ADC, MD	-	25-50%	10-25%	<10%	75-95%
E429T	ADC, MD	-	50-75%	<10%	<10%	> 95%
E443T	ADC, BD	-	50-75%	10-25%	<10%	> 95%
3	ADC, PD	+	<10%	25-50%	25-50%	10-25%
201	ADC, MD	-	50-75%	25-50%	<10%	> 75%
455	ADC, PD	-	25-50%	10-25 %	10-25%	<10%
731	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	25-50%
169	ADC, BD	-	> 95%	50-75%	<10%	50-75%
17	ADC, BD	+	<10%	10-25%	<10%	<10%

Legenda: ADC → Adenocarcinoma; PD → Pouco diferenciado; MD → Moderadamente diferenciado; BD → Bem diferenciado; Mut. → Mutação; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação.

Continuação do anexo V

Expressão das proteínas APC, p21, caspase 3 e 8 por imunohistoquímica e estado mutacional do *APC* nos tumores esporádicos MSS.

Tumores esporádicos MSS						
Tumor	Histologia	Mut. Somática	Expressão por imunohistoquímica			
		APC	APC	p21	Caspase 3	Caspase 8
37	ADC, MD	+	<10%	25-50%	<10%	<10%
E423T	ADC, MD	-	75-95%	50-75%	<10%	> 95%
815T	ADC, MD	+	10-25%	10-25%	<10%	> 95%
E414T	ADC, MD	+	10-25%	10-25%	<10%	25-50%
157	ADC, PD	+	<10%	<10%	10-25%	<10%
247	ADC, PD	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
295	ADC, MD	+	10-25%	10-25%	<10%	<10%
297	ADC, MD	-	25-50%	<10%	<10%	10-25%
305	ADC, BD	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
319	ADC, MD	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
381	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	<10%
383	ADC, PD	+	<10%	<10%	<10%	<10%
389	ADC, PD	+	<10%	10-25%	10-25%	10-25%
505	ADC, PD	+	<10%	<10%	10-25%	<10%
537	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
593	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	10-25%
849	ADC, PD	+	<10%	<10%	25-50%	<10%
713	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	<10%
189	ADC, PD	+	<10%	10-25%	<10%	<10%
187	ADC, PD	+	<10%	<10%	<10%	<10%
75	ADC, MD	+	<10%	<10%	<10%	<10%

Legenda: ADC → Adenocarcinoma; PD → Pouco diferenciado; MD → Moderadamente diferenciado; BD → Bem diferenciado; Mut. → Mutação; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação.

Anexo VI – Resultados da análise mutacional dos genes *KRAS* e *CTNNB1*.

	Tumor	Gene <i>KRAS</i>
HNPCC	53	Mutação G12D (GGT → GAT)
	199	Normal
	205	Normal
	371	Mutação G13D (GGC → GAC)
	397	Normal
	441	Normal
	445	Normal
	473	Normal
	L495T	Normal
	579	Normal
	587	Mutação G12D (GGT → GAT)
	611	Normal
	811	Normal
	719	Mutação G12D (Gly → Asp)
	787	Mutação G12D (GGT → GAT)
Esporádicos MSS	155	Normal
	489	Normal
	525	Normal
	645	Normal
	817	Normal

	Tumor	Gene <i>CTNNB1</i>
HNPCC	463	Normal
	711P	Normal
	881	Normal

Anexo VII – Soluções utilizadas.

Soluções utilizadas na imunohistoquímica:

Tampão Citrato Sódio (0,01M)

- 9 ml de ácido cítrico 0,01M
- 41 ml de citrato sódio 0,01 M
- 450 ml água destilada

Tampão Tris–EDTA 1mM

- 1,21g de tris base
- 0,37g de EDTA
- 1000 ml de água destilada

Peróxido de hidrogénio

- 2 ml peróxido de hidrogénio 30%
- 100 ml metanol

Soluções utilizadas no PCR:

Tampão tris-borato-EDTA 10x (TBE)

- 216g Tris-base
- 110g ácido bórico
- 18,61g Na₂EDTA.2H₂O

Perfez-se para um volume de 2000ml com água destilada e armazenou-se ao abrigo da luz.

Tampão TBE 1x

Diluiu-se 200ml de tampão TBE 10x em água destilada e perfez-se para um volume de 2000ml.

Gel de agarose 2%(p/v)

Dissolveram-se 5g de agarose em 250ml de tampão TBE 1x, sob aquecimento e com agitação, até a agarose estar completamente dissolvida (solução transparente). Adicionou-se 12,5µl de brometo de etídio 10mg/ml.

Solução de *Orange G* concentrado (5x)

- 12,5g Ficoll

- 0,125g *Orange G*

Dissolveu-se em água destilada e fez-se o volume até 50ml. Armazenaram-se em alíquotas de 2ml a -20°C.

Solução de Orange G diluído (1x)

Diluiu-se 100ml de *Orange G* 5x em 400ml de água destilada e armazenou-se a 4°C.

Anexo VIII – Condições utilizadas na reacção de PCR para a amplificação do gene *KRAS* e *CTNNB1*.

Gene	Exão	Temperatura de hibridação (°C)	Concentração de <i>primer</i> (pmol/ μ l)	Concentração de magnésio (mM)
<i>CTNNB1</i>	3	65 ^o	$4,8 \times 10^{-1}$	12
<i>KRAS</i>	2	58 ^o	$2,4 \times 10^{-1}$	12

Anexo IX - Correlação entre a expressão imunohistoquímica das proteínas p21, caspase 3 e 8 e as mutações nos genes *CTNNB1*, *TCF7L2* e *KRAS* em tumores esporádicos MSS e MSI, HNPCC MSS e MSI e de síndrome de Lynch.

		Nº de tumores com expressão em <10% ou ≥10% das células					
		p21		Caspase 3		Caspase 8	
Tumores	Mutações	<10%	≥10%	<10%	≥10%	<10%	≥10%
Esporádicos MSS	<i>APC</i> + (19)	12	7	15	4	12	7
	<i>APC</i> - (2)	1	1	2	0	0	2
	<i>KRAS</i> + (6)	3	3	5	1	2	4
	<i>KRAS</i> - (11)	7	4	8	3	6	5
Esporádicos MSI	<i>APC</i> + (9)	4	5	7	2	1	8
	<i>APC</i> - (4)	1	3	2	2	1	3
	<i>KRAS</i> + (2)	0	2	2	0	0	2
	<i>KRAS</i> - (9)	5	4	5	4	1	8
HNPCC MSS	<i>APC</i> + (6)	2	4	2	4	3	3
	<i>APC</i> - (3)	1	2	2	0	1	2
	<i>KRAS</i> + (5)	2	3	3	2	2	3
	<i>KRAS</i> - (4)	1	3	1	3	2	2
HNPCC MSI	<i>APC</i> + (11)	3	8	7	4	6	5
	<i>APC</i> - (7)	1	6	5	2	1	6
	<i>TCF7L2</i> + (11)	2	9	8	3	3	8
	<i>TCF7L2</i> - (7)	2	5	4	3	4	3
	<i>KRAS</i> + (2)	0	2	1	1	0	2
	<i>KRAS</i> - (8)	1	7	6	2	5	3
Síndrome de Lynch	<i>APC</i> + (23)	6	17	12	11	10	13
	<i>APC</i> - (10)	2	8	6	4	3	7
	<i>CTNNB1</i> + (8)	6 ^a	2 ^a	5	3	4	4
	<i>CTNNB1</i> - (25)	2 ^a	23 ^a	13	12	9	16
	<i>TCF7L2</i> + (19)	8 ^b	11 ^b	12	7	7	12
	<i>TCF7L2</i> - (13)	0 ^b	13 ^b	5	8	5	8
	<i>KRAS</i> + (12)	3	9	5	7	0 ^c	12 ^c
	<i>KRAS</i> - (15)	8	15	14	9	12 ^c	11 ^c

Legenda: a) p=0,0006; b) p=0,007; c) p=0,001; + → Presença de mutação; - → Ausência de mutação.