

Genética do câncer colorretal*

Genetics of colorectal cancer*

Guilherme Cutait de Castro Cotti Fábio Pires de Souza Santos*** Fernando Moreno
Sebastianes*** Angelita Habr-Gama**** Victor Edmund Seid*****
Rodrigo Bronze de Martino*******

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genética do câncer colorretal. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

RESUMO: O câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias de maior importância atualmente, tanto por sua prevalência como por sua incidência, correspondendo a 10% de todas as neoplasias nos EUA. Contudo, nos últimos 50 anos, sua mortalidade permaneceu praticamente inalterada. Desde que Morson, em 1978, descreveu pela primeira vez a seqüência adenoma-carcinoma, a elucidação da genética molecular envolvida na patogênese do CCR passou a ser estudada intensamente e muitos avanços foram obtidos. Vários genes como APC, DCC e p53, entre outros, foram identificados como participantes da seqüência adenoma-carcinoma, estando envolvidos na gênese tumoral baseada na teoria de múltiplos passos, onde o acúmulo de mutações genéticas em células instáveis é o fator principal que acaba por originar o câncer. Há dois tipos básicos de CCR: o esporádico, que corresponde a 85% do total de casos de CCR; e o familiar, com cerca de 15% dos casos e destaque para a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) e o Câncer Colorretal Hereditário não-poliposo (HNPCC). As pesquisas atuais vêm decifrando o mecanismo de ação de tais genes, buscando determinar a importância e valor prognóstico dos mesmos. Espera-se que a elucidação completa de tais mecanismos permita uma diminuição não só da mortalidade do CCR, mas também do impacto social imposto por tal doença. Ademais, a elaboração de tratamentos alternativos à cirurgia parece possível, através da terapia genética. Portanto, familiarizar-se com a Genética do Câncer Colorretal e os avanços nessa área torna-se imperativo para clínicos e cirurgiões da área digestiva.

DESCRITORES: Neoplasias colorretais/genética; Neoplasias colorretais/epidemiologia; Sequências de bases/genética; Polipose adenomatosa do colon/genética; Adenocarcinoma/epidemiologia; Adenocarcinoma/genética; Mutação/genética.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) representa uma das neoplasias de maior importância no Ocidente, tanto por Ocidente, tanto por sua prevalência como por sua incidência. Estima-se que nos Estados Unidos, o CCR corresponda a 10% do total de todas as neoplasias, sendo responsável por aproximadamente 131.600 novos casos e 55.000 mortes anuais e com uma estimativa de que 5% das pessoas desenvolverão a

doença em algum momento de suas vidas⁶⁷. Atualmente, o CCR corresponde à terceira causa de morte por câncer tanto em homens (atrás somente do câncer de pulmão e próstata) quanto em mulheres (atrás do câncer de pulmão e mama)⁶⁷. No Brasil, estima-se que a incidência de CCR em 1996 foi de 17.000 novos casos, com discreta maior prevalência no sexo feminino. Contudo, a despeito de todos os

* Prêmio Monografias (área cirurgia) - COMU, 1999.

** Acadêmico do 4º ano da FMUSP, membro da Liga de Iniciação em Coloproctologia.

*** Acadêmicos do 3º ano da FMUSP, membros da Liga de Iniciação em Coloproctologia.

**** Profª Titular da Disciplina de Coloproctologia da FMUSP e Chefe do Depto. de Gastroenterologia (orientadora).

***** Médicos Residentes do Departamento de Cirurgia da FMUSP (orientadores).

esforços empregados para melhoria do diagnóstico e tratamento do CCR, sua mortalidade permaneceu praticamente inalterada nos últimos 50 anos, sendo a sobrevida em 5 anos ao redor de 60%¹⁰⁶

Por se tratar de problema de saúde pública com grande impacto social, a elucidação da patogênese molecular do CCR vem recebendo muita atenção da comunidade de pesquisa científica nos últimos anos. Como resultado de grande investigação, diversas mutações no código genético de células epiteliais colônicas foram identificadas como responsáveis pela perda do crescimento celular normal e diferenciação, resultando na transformação neoplásica de células epiteliais do intestino grosso, em doentes com CCR esporádico⁷⁶

Vogelstein¹³⁶ a partir dos achados obtidos com experiências em tumores esporádicos, postulou a provável seqüência de mutações genéticas mais freqüentemente identificadas no CCR, bem como correlacionou a ocorrência de tais mutações a lesões amplamente aceitas como precursoras de CCR. Dessa forma, surgiu a possibilidade de identificar os defeitos genéticos associados ao CCR, vislumbrou-se uma nova perspectiva para o rastreamento e tratamento eficaz da doença e gerou-se a possibilidade de melhorar os resultados de sobrevida do CCR, que, como dito, demonstraram pouca ou nenhuma melhora nos últimos 50 anos.

Patologia do CCR

Sir Rupert Willis definiu o termo neoplasia como uma massa de tecido anormal que não responde adequadamente aos sinais envolvidos no crescimento e diferenciação celular e, portanto, cujo crescimento ocorre de maneira não coordenada em comparação com o tecido normal. O termo câncer engloba todas as neoplasias, ou tumores, de caráter maligno, que apresentam capacidade de invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para sítios distantes (metástases)¹⁴⁷

O cólon, incluindo o reto, é o sítio mais freqüente de neoplasias primárias do que qualquer outro órgão em todo o corpo humano¹¹². No intestino grosso, podem ocorrer tanto neoplasias de origem benigna, os adenomas, quanto de origem maligna, os carcinomas. Os adenocarcinomas constituem a quase totalidade dos cânceres colorretais, e representam 70% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal. São compostos de células originadas do epitélio das glândulas intestinais que, após acúmulo de mutações em seu material genético, originam o CCR.

Uma associação entre carcinoma e pólipos colorretais foi descrita em 1978 por Morson et al.⁴⁹, baseada em observações clínicas, epidemiológicas

e anátomo-patológicas, sendo conhecida hoje como seqüência "adenoma-carcinoma". Apesar da falta de estudos prospectivos e bem controlados, parece ser verdade que a maioria dos carcinomas do cólon e reto (aproximadamente 95% destes) desenvolvem-se a partir dos adenomas, onde algumas etapas tanto macroscópicas quanto microscópicas vem sendo estabelecidas e, por sua vez, correlacionadas com alterações genéticas, conforme será abordado mais adiante.

Um pólipio representa uma massa tumoral protusa em direção à luz intestinal. Inicia-se como uma pequena massa séssil que, à medida que aumenta de tamanho, pode permanecer como séssil ou adquirir uma haste, tornando-se pediculado.

Há que se ressaltar que nem todo pólipio tem características neoplásicas. Pólipos hiperplásicos, hamartomatosos (pólipos juvenis e das Síndromes de Peutz-Jeghers e Cronkhite-Canada), inflamatórios e linfóides, são todos definidos como não-neoplásicos, pois nesses não há atipia ou displasia e suas histórias naturais não se relacionam com o surgimento de neoplasias, via de regra. Entretanto, pólipos epiteliais que resultam de proliferação anormal numa mucosa displásica são denominados adenomas e representam as verdadeiras lesões neoplásicas pré-malignas do intestino grosso. A prevalência dos adenomas na população geral gira em torno de 20 a 30% abaixo dos 40 anos de idade e entre 40 a 50% após os 60 anos¹¹². A freqüência é a mesma para ambos os sexos, havendo uma bem definida predisposição familiar para o surgimento de adenomas esporádicos. Os pólipos adenomatosos são divididos em 3 subtipos:

a) *adenomas tubulares*: apresentam mais de 75% de sua arquitetura composta por glândulas tubulares e são a grande maioria dos adenomas;

b) *adenomas vilosos*: apresentam mais que 50% de projeções vilosas, representando apenas 1% do total de adenomas;

c) *adenomas túbulo-vilosos*: constituindo entre 5 a 10% dos adenomas colorretais, são constituídos por um misto de glândulas tubulares e projeções vilosas, onde estas últimas compõe entre 25 e 50% do total da arquitetura da lesão.

O risco de malignidade em um pólipio adenomatoso correlaciona-se com três fatores independentes: tamanho do pólipio, arquitetura histológica e grau de displasia epitelial³. De fato, é rara a ocorrência de câncer em adenomas menores do que 1cm, os adenomas vilosos apresentam maior risco de malignização e graus de displasia severa são mais freqüentemente encontrados em áreas de arquitetura vilosa. A displasia epitelial refere-se à aparência microscópica das células neoplásicas epiteliais do adenoma, sendo classificada em: leve,

moderada e intensa. Tal classificação baseia-se em características celulares tais como a polaridade celular, o grau de condensação da cromatina, o aspecto e forma dos núcleos, a presença de mitoses atípicas ou mitoses em toda espessura epitelial, entre outras. Este conjunto de alterações reflete a perda do controle do crescimento celular pelo acúmulo de mutações nos genes envolvidos com esta função. Assim, na displasia leve as células são muito semelhantes às células epiteliais normais, sendo este diagnóstico difícil e sua interpretação variando muito entre diferentes patologistas. Na displasia acentuada as células assemelham-se àquelas de um câncer e, de fato, o adenoma com displasia intensa constitui um carcinoma *in situ*.

Conclui-se então que os adenomas, neoplasias benignas pré-existentes, constituem

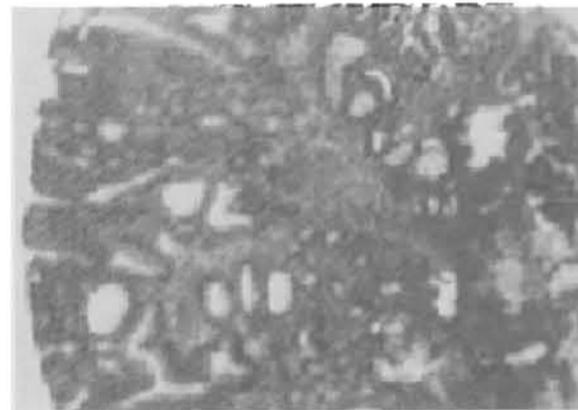
terreno fértil para a transformação maligna sob certas circunstâncias; contudo, na realidade, apenas uma pequena porcentagem destas lesões irá de fato dar origem aos carcinomas colorretais. Conforme veremos adiante, parece certo admitir que a herança, mas sobretudo a ação direta de agentes carcinogênicos sobre a mucosa colorretal, resulta em acúmulo de defeitos genéticos parcialmente identificados e que concorrem para a carcinogênese epitelial no intestino grosso.

Seqüência adeno-carcinoma

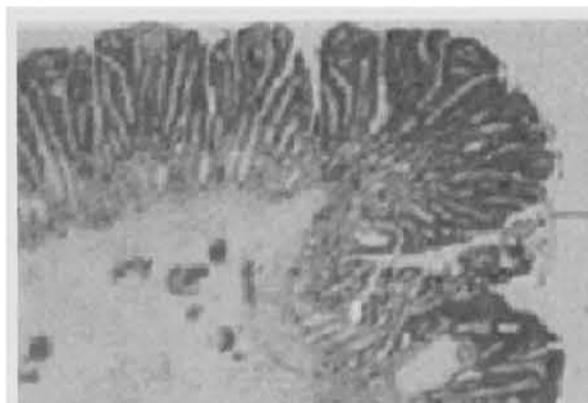
A seqüência adenoma-carcinoma foi descrita pela primeira vez por Morson em 1978⁴⁹ (Figura 1).



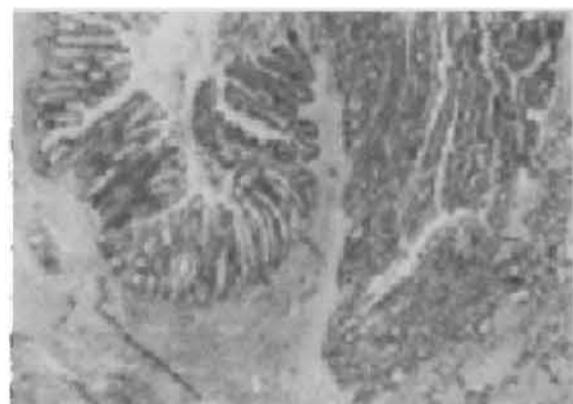
Mucosa colônica normal



Adenoma benigno (precoce)



Adenoma benigno (tardio)



Carcinoma maligno invasivo

Figura 1 - Seqüência adenoma-carcinoma.

(Fonte: <http://bst2.bioscience.drexel.edu/biology/ebe/molcellbiol/colon/project.htm>)

Os carcinomas colorretais raramente provêm da mucosa intestinal quando não pode ser identificada lesão adenomatosa associada. Assim, eles apresentam uma lesão precursora não maligna: o adenoma displásico. As primeiras alterações epiteliais na seqüência adenoma-carcinoma, já descritas em humanos, foram denominadas criptas aberrantes. Estas consistem em algumas criptas que apresentam um lúmen alargado e de forma anormal. A histologia é característica de alterações displásicas e, portanto, podem ser classificadas como

microadenomas. Essas alterações consistem em expansão da zona proliferativa de células na cripta colônica, passando a incluir células localizadas ou próximas da superfície epitelial. Com a continuação do crescimento, o foco de criptas aberrantes e displásicas provavelmente origina uma lesão polipóide visível. Com o decorrer do tempo, as células do adenoma vão sofrendo alterações, tornando-se menos diferenciadas e mais displásicas. Finalmente, elas adquirem o fenótipo de um carcinoma com a capacidade de ultrapassar a

barreira da lâmina própria e atingir a mucosa. Em seguida, novas alterações genéticas permitem-nas, após se distribuir pela mucosa e envolver a parede colônica, adquirir a capacidade de metastatizar a linfonodos locais ou órgãos distantes. Modelos animais de tumorigênese no cólon e estudos clínicos observacionais embasaram a seqüência adenoma-carcinoma. As evidências principais são as seguintes⁴⁹:

- populações que apresentam uma alta prevalência de adenomas apresentam uma alta prevalência de CCR e vice-versa;

- a distribuição do adenoma no cólon e reto é similar à do CCR;

- a ocorrência de pólipos adenomatosos antecede por cerca de 10 a 15 anos a de CCR;

- quando um CCR invasivo é diagnosticado precocemente, tecido adenomatoso ao redor é frequentemente identificado;

- o risco de câncer encontra-se diretamente relacionado ao número de adenomas e, por isso, probabilidade de CCR em pacientes com síndromes de polipose adenomatosa familiar (PAF) é de 100%.

- programas de polipectomias colonoscópicas reduzem a incidência de CCR nos pacientes, funcionando como medida de prevenção secundária ao CCR.

As neoplasias do cólon, incluindo adenomas e carcinomas, são monoclonais por natureza, ou seja, provêm de uma única célula. Assim, uma célula no epitélio normal sofre uma ou mais modificações que conferem uma vantagem de crescimento seletiva em relação às células epiteliais ao redor. A progressão de um microadenoma para um adenoma, e deste para um carcinoma, resulta de uma série de modificações genéticas que se acumulam em uma população clonal, gerando células com crescimento ou características de sobrevivência aumentadas em cada mutação nova gerada. Este processo de carcinogênese com múltiplos passos no desenvolvimento do CCR sugere que vários eventos genéticos sejam necessários antes que uma célula verdadeiramente maligna seja gerada. A possibilidade de identificar alteração genética associada a lesões pré-malignas de CCR, tais como um adenoma viloso com displasia acentuada ou lesões de criptas aberrantes, representam a base metodológica e o objetivo do rastreamento genético do CCR.

Características da ocorrência da CCR

O CCR divide-se basicamente em dois grandes grupos: o CCR esporádico, que corresponde a 85% do total das neoplasias malignas colorretais; e o CCR hereditário, que compreende aproximadamente 15% do total dos CCR¹¹². O CCR

hereditário apresenta duas subdivisões: a Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (Figura 2), que corresponde a menos de 1% de todos os casos de CCR; e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), que corresponde a cerca de 10% do total dos casos de CCR. Mesmo contribuindo com apenas uma pequena proporção dos casos de CCR, a Síndrome da Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) serviu como um paradigma clínico e de pesquisa para o diagnóstico e tratamento do câncer colorretal hereditário⁷⁶. Do mesmo modo, a PAF constituiu um elo crítico na elucidação da genética molecular envolvida na carcinogênese colorretal, pois foi através de estudos desses pacientes portadores de PAF que se postulou o modelo de carcinogênese em múltiplos passos, no qual o acúmulo de mutações genéticas é responsável pela progressão do epitélio colônico normal para adenoma displásico e deste para um carcinoma invasivo¹³⁶. Este trabalho culminou com a identificação e clonagem do gene APC, que será descrito adiante. A PAF apresenta padrão de herança autossômica dominante, e nela observa-se a ocorrência de centenas a milhares de adenomas tubulares (embora lesões tubulovilosas, vilosas ou hiperplásicas possam estar presentes). O tratamento de escolha é a proctocolectomia ou a colectomia subtotal com acompanhamento anual através de retossigmoidoscopia, para exame do segmento intestinal remanescente. A realização de endoscopia digestiva alta com certa periodicidade também é necessária, tendo em vista a possibilidade de ocorrência de adenomas gástricos e duodenais, com risco de malignização. Além disto, tumores desmóides também podem ocorrer⁷⁶.

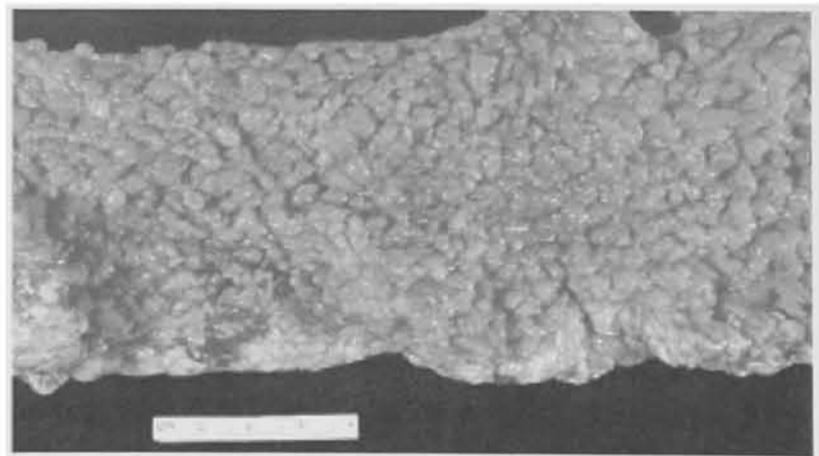


Figura 2 Cólon de paciente com PAF. (Fonte: <http://www-medlib.med.utah.edu/WebPath/GIHTML/GI143.html>)

O câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) apresenta herança autossômica dominante com penetrância entre 80 e 85%, onde as mutações ocorrem em genes envolvidos no reparo do DNA¹²⁸ tais como hMSH2, hMLH1



hPMS1 e hPMS2. Os eventos mutacionais estão acelerados pelo reparo inadequado do DNA e, assim, a evolução de um adenoma colorretal para carcinoma ocorre em um período mais curto⁵³ em comparação com uma média de 8 a 10 anos na população geral¹⁴⁸. Há maior ocorrência de carcinomas no cólon direito (cerca de 70% dos tumores são proximais à flexura esplênica), maior número de tumores sincrônicos e/ou metacrônicos⁷⁶ e melhor prognóstico do que os CCR esporádicos¹¹⁷ embora os motivos que levem a uma melhor sobrevida ainda não sejam esclarecidos (suspeita-se que a resposta imune no HNPCC tenha um papel central neste ponto). Tumores primários extracolônicos também podem associar-se ao fenótipo do HNPCC, principalmente os localizados no útero, ureter, pelve renal, intestino delgado, estômago, ovário e vias biliares¹⁴². Pacientes com história familiar sugestiva de HNPCC, que preenchem critérios de Amsterdã ou Bethesda (Tabela 1), devem iniciar rastreamento colonoscópico anual ou a cada dois anos, já a partir dos 20 anos, e anualmente a partir dos 40. O tratamento cirúrgico, quando está demonstrada a mutação nos genes reparadores de DNA, é controverso e profilático, envolvendo colectomia subtotal com reavaliação anual do segmento retal⁷⁶.

Tabela 1 – Critérios de Amsterdã II (conforme Vassen et al., 1999)¹³⁴.

Critérios de Amsterdã II (rev. em julho de 1999)	
Paciente com CCR deve ter as seguintes características para classificar sua família como portadora da síndrome HNPCC:	
1. Pelo menos três parentes com câncer associado ao HNPCC (CCR, endometrial, intestino delgado, ureter e renal).	
2. Um deles deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.	
3. Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.	
4. Pelo menos um caso de câncer tem de ter sido diagnosticado antes dos 50 anos.	
5. A síndrome PAF deve ser excluída em casos de CCR.	
6. Os tumores devem ter seus diagnósticos confirmados por exame e anátomo-patológico.	

Como se pode depreender da análise das características clínicas das síndromes de CCR hereditário expostas na Tabela 2, é de fundamental importância conhecer a possibilidade de herança genética em doentes para os quais o diagnóstico CCR já tenha sido feito, uma vez que este achado resultará em tratamento diferenciado. Da mesma forma, a possibilidade de detectar presença de herança genética antes do diagnóstico de CCR para um determinado indivíduo, resultará em vigilância diferenciada resultando em maior sobrevida.

Tabela 2 Características de PAF e HNPCC.

	PAF	HNPCC
Padrão de herança	Autossômica dominante	Autossômica dominante
Mutação germinativa	gene APC (5q21) hPMS1, hPMS2).	Qualquer um dos genes de reparo do DNA (hMSH2, hMLH1,
Pólipos	Adenomatosos, com início no cólon distal e reto; normalmente > 100. Podem ocorrer adenomas no intestino delgado e pólipos gástricos são comuns.	Os pólipos de cólon ocorrem na mesma frequência que na população geral. Adenomas colônicos são ocasionais, normalmente grandes e vilosos, ocorrendo em faixas etárias precoces.
Câncer	CCR, aproximadamente aos 40 anos; muitos casos em jovens aos 20 anos; câncer de intestino delgado, estômago (principalmente no Japão), tireóide, carcinomaperiampular e outros podem ocorrer.	CCR com tendência proximal, excesso de tumores sincrônicos e metacrônicos. Podem ocorrer também câncer e de endométrio, ovário, intestino delgado, estômago, ureter e pelve renal. Idade média ao diagnóstico é de 44 anos.
Diagnostico/ rastreamento	Retossigmoidoscopia periódica a partir dos 10 anos. Endoscopia digestiva alta a cada 1 a 3 anos. Rastreamento do segmento retal remanescente após	Colonoscopia, com início aos 20 anos, anual para portadores de mutação em genes de reparo do DNA; a cada 2 anos quando não são realizados estudos de mutação. Biópsia aspirativa do endométrio quando realizar as colonoscopias.
cirurgia profilática		
Tratamento cirúrgico/ profilático	Colectomia subtotal profilática com anastomose ileo-retal; ou proctocolectomia retal com reservatório ileal.	Colectomia subtotal para estágios iniciais de CCR. Considerar possibilidade de colectomia total para portadores e de mutação conhecida em genes de reparo do DNA e considerar histerectomia total e ooforectomia profilática para pacientes com CCR inicial que já constituíram sua família.
Aconselhamento genético*	SIM. Detecção de mutação desconhecida no gene APC no sangue- R\$ 750,00. Detecção de Mutação Conhecida no gene APC no sangue para familiares - R\$ 150,00.	SIM. Detecção de mutação desconhecida nos genes MMR no sangue 1750. Detecção de mutação conhecida nos genes MMR no sangue para familiares R\$ 150,00.

* Conforme pesquisa ao Instituto Ludwig do Hospital do Câncer em São Paulo, SP.

Eventos genéticos envolvidos na patogenia da CCR

Em 1895, a costureira do Dr. Alfred Warthin lhe disse que ela esperava morrer de câncer. Ela estava saudável naquele momento, mas muitos de seus parentes haviam morrido de câncer do cólon e outras doenças malignas. O Dr. Warthin, que era Professor de Patologia na Universidade de Michigan, ficou intrigado pela história, e decidiu investigar os arquivos locais de Patologia a respeito da família de sua costureira, que acabou se tornando a família "G" - o protótipo de todas as famílias com síndromes de câncer familiar. Posteriormente, descobriu-se que a história da família "G" permitia classificá-la como suscetível à Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC)^{45,75,140,141}

Como foi visto, sabe-se que há duas síndromes familiares em que a herança de um gene mutado aumenta muito a probabilidade de CCR: a PAF e o HNPCC. Apesar de serem síndromes genéticas herdadas pelas várias gerações de uma família, os mecanismos de carcinogênese envolvem a herança genética e uma seqüência elaborada de outras alterações genéticas somáticas que se juntam ao fator herdado para propiciar a carcinogênese. Tais alterações genéticas somáticas levam décadas para ocorrer, o que explica o fato de uma pessoa com PAF ter seu primeiro adenoma aos 16 anos, mas apenas ter CCR diagnosticado ao redor dos 40 anos. Percebeu-se então que as pessoas acometidas pelas síndromes apresentavam uma instabilidade genômica, decorrente da mutação genética herdada, que as predisponha a terem mais mutações somáticas. Ou seja, a mutação herdada facilitava a ocorrência de novas mutações.

Embora estime-se que a PAF e o HNPCC sejam responsáveis por 1% e 10%, respectivamente, de todos os casos de CCR, o estudo das mutações nestes casos é de grande valia para avaliação dos casos de CCR esporádico, pois as etapas genéticas são essencialmente as mesmas. Por volta de 15% dos CCR esporádicos resultaram de duas mutações somáticas a um gene envolvido no reparo de DNA, tendo como consequência a mesma hipermutabilidade vista nos pacientes com HNPCC. Os 85% restantes parecem ser resultado de duas mutações somáticas no gene APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), ou algum outro gene supressor tumoral, seguido pela mesma instabilidade cromossômica encontrada na PAF

Categorias de genes envolvidos na carcinogênese colorretal¹¹²

1) Genes supressores tumorais - são genes

cuja função é regular o crescimento e a proliferação celular. Uma alteração genética que leve à perda de função deste gene permitiria uma proliferação celular irrefreada, facilitando o desenvolvimento de neoplasias. Perda de função de genes supressores tumorais são, portanto, eventos relativamente freqüentes no surgimento de neoplasias em todo o corpo.

2) Oncogenes são genes que codificam para proteínas que promovem crescimento celular normal e diferenciação. A ocorrência de uma alteração na estrutura do protooncogene (levando à síntese de uma proteína alterada) ou de uma mudança na regulação da expressão do gene (que passa a ser excessivamente expresso), resulta na transformação do proto-oncogene em um oncogene, que promove proliferação celular desregulada e o surgimento de neoplasias.

3) Genes envolvidos no reparo de DNA são os genes do complexo MMR (Mismatch Repair) que são responsáveis pela correção de erros de pareamento de bases do DNA após a ação da DNA polimerase para duplicação do DNA. A mutação desses genes deixa o DNA em um estado de hipermutabilidade, apresentando um maior número de mutações (pois os erros da DNA polimerase não são corrigidos) e causando o fenótipo de instabilidade de microssatélites, que são seqüências altamente repetitivas de DNA e muito sujeitas a sofrerem erros durante a replicação pela DNA polimerase.

Vias genéticas da carcinogênese colorretal (Figura 3)

1) Via da instabilidade cromossômica: ocorre na PAF, onde o paciente herda uma mutação no gene supressor tumoral APC. A função normal deste gene é bloquear a proliferação celular incontrolada. Ela só ocorre, porém, se a célula tiver seus dois alelos inativados. No caso da PAF, o primeiro alelo inativo é herdado, e a perda do segundo alelo permite o desenvolvimento de um adenoma, um evento com grande probabilidade de ocorrer, já que todas as células apresentam um alelo inativo. Isto explica o aparecimento de múltiplos adenomas na PAF. Em um CCR esporádico, deveria ocorrer a perda dos dois alelos do gene APC em uma mesma célula para que houvesse o surgimento de um adenoma, portanto um evento mais difícil de ocorrer. Por razões não bem compreendidas, a perda dos dois alelos do gene APC deixa o cromossomo da célula instável e

mais suscetível a sofrer deleções ou mutações somáticas, levando a perda ou inativação de mais

genes supressores tumorais ou ativação de oncogenes.

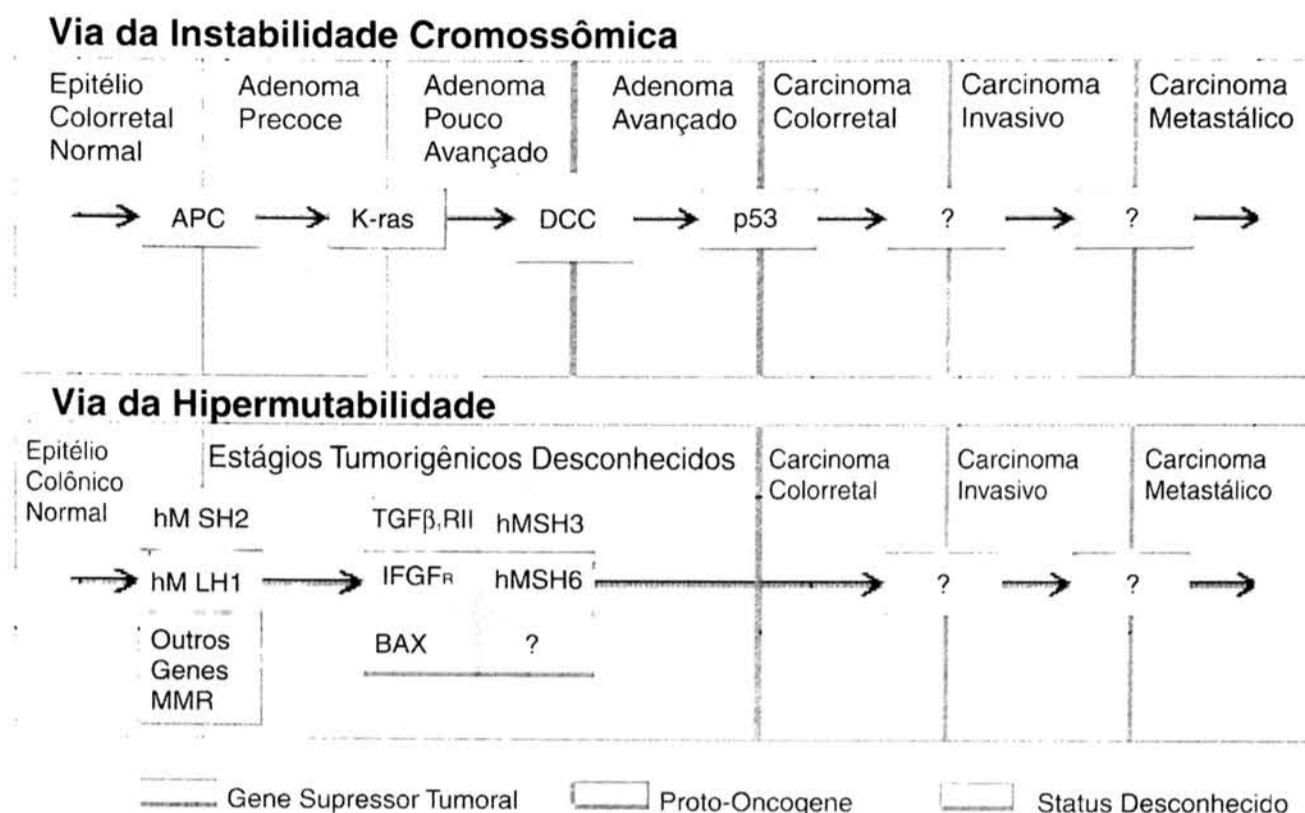


Figura 3 Vias genéticas de carcinogênese colorretal.

2) Via da hipermutabilidade do DNA

Ocorre no HNPCC, em que a alteração genética herdada é a inativação de um dos alelos dos genes envolvidos no reparo do DNA (genes hMSH2 e hMLH1, principalmente). A inativação do segundo alelo faz com que a célula perca sua capacidade de realizar reparos no DNA, o que abre caminho para o surgimento de diversas mutações somáticas que acabam por levar ao surgimento de CCR.

GENES ENVOLVIDOS NA CARCINOGENESE COLORRETAL

1) Gene APC

O gene responsável pela PAF, denominado de APC (*Adenomatous Polyposis Coli*), foi identificado em 1991 e localiza-se no cromossomo 5q21-22^{41,48,58,55}

Mutações herdadas no gene APC foram demonstradas em 80% dos pacientes com PAF⁸⁵. Seguindo a hipótese de Knudson⁶⁰ de que duas alterações genéticas são necessárias para o desenvolvimento de câncer, alterações em ambos os alelos do gene APC foram identificadas em pacientes que haviam desenvolvido CCR na PAF. A mutação germinativa é acompanhada por uma mutação somática ou, mais comumente, por uma deleção cromossômica. O gene APC é, portanto, um gene supressor tumoral clássico, necessitando da inativação de suas duas cópias para favorecer a carcinogênese^{85,86}.

Embora o gene APC tenha sido primeiramente demonstrado como o gene responsável pela PAF, um estudo em 1987 constatou sua importância no CCR esporádico ao identificar deleções no cromossomo 5q em 20% dos carcinomas colorretais esporádicos¹²⁵. Outros estudos com CCR esporádico constataram que a deleção do 5q ou mutações do gene APC estavam presentes com frequência semelhante entre os adenomas sem microinvasão, os adenomas com microinvasão e os carcinomas invasivos, sugerindo ser a inativação do gene APC por mutação e/ou deleção uma alteração precoce ou até mesmo iniciadora do desenvolvimento dos CCR esporádicos^{86,136}.

No que se refere à sua estrutura, o gene APC consiste de 8538 nucleotídeos distribuídos por 15 éxons transcritos que codificam uma proteína citoplasmática com 300 kDa e 2843 aminoácidos^{41,58}. Esta proteína apresenta semelhança de seqüências de aminoácidos com as proteínas dos filamentos intermediários, como miosina e ceratina⁴¹ e sua expressão é mais elevada na porção superior da cripta, sugerindo uma relação com o grau de maturação da célula¹²⁴. Estudos demonstraram ser a proteína mutante do gene APC solúvel no citoplasma, enquanto que a proteína do tipo selvagem é insolúvel. Outros estudos demonstraram que, *in vitro*, a proteína truncada forma complexos com a proteína selvagem. A proteína truncada pode, então, interferir na função da proteína selvagem, o que significa que o gene APC também pode funcionar de modo dominante negativo nas células heterozigóticas *in vivo*^{124,129}.

Várias funções já foram atribuídas à proteína APC. Em primeiro lugar, ela tem um papel importante na regulação da proliferação celular, dada sua habilidade de inibir a progressão das células da fase G1 (ou pré-sintética de DNA) para a fase S (de síntese de DNA) do ciclo celular. Também se suspeita de uma função da proteína nos mecanismos de apoptose¹⁴. Sabe-se também que a proteína APC interage com uma série de outras proteínas, dentre as quais as que mais têm sido alvo de estudo são as cateninas, especialmente a beta-catenina. As cateninas (alfa, beta e gama) são uma família de proteínas citoplasmáticas com função de adesão intercelular, fazendo parte, juntamente com a placoglobina, dos complexos de junção aderente e dos desmossomos^{102,115}. Normalmente, a proteína APC se liga à beta-catenina por um sítio codificado no éxon 15 e permite a ligação da enzima glicogênio sintase quinase 3 (GSK3) promovendo assim a degradação da beta-catenina⁷⁵.

Um bloqueio desta destruição, com inibição da GSK3, é realizado pelo fator de crescimento Wnt-1. Com a inibição, aumentam-se os níveis de beta-catenina, que se torna livre para interagir com duas outras proteínas. Forma então um complexo com a alfa-catenina e este complexo se liga ao domínio citoplasmático da E-caderina, uma outra proteína transmembrana cuja porção extracelular se liga à uma proteína semelhante numa célula vizinha e forma uma adesão intercelular. O complexo das cateninas medeia então a interação entre a E-caderina e o citoesqueleto, que é essencial para a replicação celular²⁰. A beta-catenina também pode funcionar como um fator ativador de transcrição do DNA, se complexando com o fator da célula T (Tcf), formando um complexo molecular ativador de transcrição de DNA e iniciando, provavelmente, a transcrição de genes que promovem a proliferação celular ou inibem a apoptose^{83,87,105,115,129}. A perda da proteína APC funcionaria então como uma sinalização contínua por Wnt-1. Resumindo, a proteína APC teria então uma função de retirar o excesso de beta-catenina, modulando o nível desta no citoplasma e afetando a estrutura celular e vias de transdução de sinais relacionadas à proliferação celular, controlando deste modo a replicação celular⁸⁹.

A partir da identificação do gene APC, iniciaram-se vários estudos para detectar as diferentes mutações existentes. Mutações somáticas deste gene foram encontradas em até 81% dos casos de carcinoma colorretal esporádico^{86,102}. Muito embora não tenha sido demonstrada a necessidade de inativação do alelo remanescente para desenvolvimento maligno do tumor, na maior parte (mais de 50%) dos casos de adenocarcinoma colorretal, havia mutações em ambos os alelos⁸⁶.

Nos pacientes com PAF foram encontradas mutações nas linhagens germinativas de 67% a 80% dos pacientes, todos sem parentesco^{85,86}. No gene APC, percebeu-se que há uma região, conhecida como MCR (*Mutation Cluster Region* - região de aglomeração de mutações), que acumula a maioria das mutações, apresentando por volta de 75% das mutações somáticas em tumores esporádicos^{9, 85}. Nos pacientes com PAF, porém, essa região é responsável por apenas 23% das mutações germinativas⁸⁶. O códon 1309, localizado na MCR, é o alvo mais frequente de mutações germinativas e somáticas^{40,41}. Embora não haja nenhum estudo detectando uma correlação direta entre o local da mutação e o fenótipo, é possível que as mutações no códon 1309 estejam associadas ao desenvolvimento precoce da PAF, enquanto as mutações localizadas na extremidade 5' do gene se associem a fenótipos mais brandos e de início mais tardio^{104,127}. As evidências acima indicam que o gene APC codifica uma proteína com papel crítico nos processos de interações intercelulares e regulação da proliferação celular. A sua disfunção resultante de uma deleção alélica ou outras mutações tem papel primordial e precoce na cascata de alterações genéticas responsável pelo surgimento da PAF e do CCR esporádico.

2) Gene K-Ras

Para que haja uma manutenção adequada da homeostase e do desenvolvimento celular, é necessária a interação da célula com o meio extracelular. Para que este processo ocorra, existe uma cadeia de sinalizadores que captam sinais recebidos do meio extracelular por receptores e fazem a transdução destes sinais de modo a passar a informação para o núcleo celular⁷. Nesta cadeia de sinalizadores há um grupo de proteínas conhecidas como ras (de "*Rat Sarcoma*" - pois foram relacionadas mutações destas proteínas com o desenvolvimento de sarcomas em ratos), altamente conservado entre as espécies de animais superiores. Neste grupo de proteínas podem-se identificar três subgrupos: N-ras, H-ras e K-ras. As proteínas ras desempenham um papel importante na transdução de sinais mitogênicos através da membrana plasmática, com a estimulação de cascatas enzimáticas que levam à progressão da célula no ciclo de replicação celular. Pode-se deduzir, portanto, que uma mutação que leva à uma ativação permanente destas proteínas tem um papel importante nos mecanismos de carcinogênese⁵.

Mutações no gene ras constituem a alteração oncogênica mais comum em tumores humanos²². O gene K-ras é o gene mais estudado dentre a família ras. Localizado no braço curto do cromossomo 12, o gene K-ras codifica a proteína de 21 kDa

conhecida como p21-ras. Quando o gene K-ras sofre uma mutação, há uma diminuição na interação da proteína p21-ras com a proteína ativadora da GTP-ase (ras-GAP), ficando a proteína p21-ras permanentemente ligada com GTP, ou seja, permanentemente no estado ativo. A proteína p21-ras no seu estado ativo realiza a fosforilação de um resíduo de serina da proteína raf-1, que por sua vez ativa uma cascata de quinases que acabam por ativar fatores de transcrição nucleares como o c-myc. Como a p21-ras mutada está sempre ativa, tem-se como consequência uma sinalização contínua para o núcleo e uma estimulação potente para a proliferação celular. Pode-se dizer, então, que o gene K-ras é um protooncogene, o qual uma vez ativado se torna um oncogene, ou seja, um gene que estimula a proliferação celular neoplásica^{5,12}

Mutações do gene K-ras foram identificadas em até 47% dos carcinomas colorretais esporádicos, assim como em 58% dos adenomas com mais de um centímetro e com displasia de alto grau^{11,15,28,29,62,136}. Em comparação, apenas 9% dos adenomas com menos de 1 cm apresentavam estas mutações¹³⁶. Estes dados contrastam com os obtidos para as deleções e mutações do gene APC, indicando que as mutações do gene K-ras ocorrem em células carregando já dois alelos inativados do APC. Recentemente foram relatadas mutações do gene K-ras nos focos de criptas aberrantes, com freqüências de 58% a 73%^{74,105}. Nessas criptas os índices de mutação do APC são muito menores. Isto sugere que, com o APC intacto, uma mutação ativadora do K-ras leva apenas à formação da cripta aberrante, que é uma lesão não neoplásica e não progressiva. Por outro lado, a disfunção do APC é encontrada em focos displásicos de criptas aberrantes e em adenomas, e nestes casos o K-ras ativado dá uma certa "dianteira" para a proliferação neoplásica¹²². Frente a esses dados, pode-se dizer que as mutações do gene K-ras são fatores relativamente precoces na tumorigênese colorretal, ocorrendo antes das transformações malignas¹³⁶

A mutação encontrada mais frequentemente é uma mutação pontual no códon 12, embora possam ser encontradas mutações também nos códons 13 e 61^{11,33,126,136}. Estudos mais recentes indicam que, provavelmente, as variadas mutações do gene K-ras estariam relacionadas com diferenças de agressividade biológica, comportamento tumoral e prognóstico para o paciente, embora isto ainda não tenha sido confirmado^{8,31,32,126}

O gene K-Ras é o principal protooncogene encontrado no CCR, sendo de extrema valia na transdução regular de sinais estimuladores da proliferação celular. Quando mutado, porém, serve de potente estímulo para a carcinogênese colorretal.

3) Gene DCC

Estudos citogenéticos de 1985 mostraram que a deleção alélica do braço longo do cromossomo 18 era uma alteração genética relativamente comum no câncer colorretal⁸⁸ sendo posteriormente localizada no *locus* 18q2¹³⁶. A introdução do cromossomo 18 em linhagens celulares de CCR inibiu o potencial maligno destas células, indicando que o gene localizado na região deletada era um gene supressor tumoral³⁸. Através de estudos com clonagem posicional, pôde-se identificar e clonar um gene localizado nessa região, ao qual foi dado o nome de DCC (*Deleted in Colon Cancer*)²⁶.

O gene DCC é um gene enorme, com mais de 1,35 milhões de pares de bases e no mínimo 29 éxons²⁶. Codifica uma proteína transmembrana com 180 kDa, 1447 aminoácidos e uma porção extracelular com domínios semelhantes à imunoglobulina e fibronectina III. Foi constatado que a estrutura da proteína do gene DCC é homóloga a das proteínas N-CAMs, que são moléculas de adesão celular neural envolvidas na comunicação intercelular⁴⁶. Deduziu-se, então, que a proteína DCC desempenha uma função essencial na modulação da adesão célula-célula, e, desse modo, modula o crescimento e a diferenciação celular na cripta colônica normal⁹¹

As deleções do cromossomo 18q ocorrem em aproximadamente 73% dos carcinomas esporádicos, 47% dos adenomas com áreas de microinvasão e apenas 11% dos adenomas sem áreas de microinvasão. Estes resultados sugerem que a perda do 18q é um evento relativamente tardio na carcinogênese colorretal^{19,27,28,29,136}.

Com a descoberta do gene DCC, vários estudos subseqüentes vem tentando estabelecer a correlação entre a perda do 18q e o estágio do tumor. Demonstrou-se que praticamente todas as metástases hepáticas apresentavam deleção do 18q⁹⁵. Um outro estudo constatou que 67% dos CCR nos estágios B e C de Dukes apresentavam perda total ou parcial do 18q, sendo esta perda maior nos tumores no estágio C. Esse estudo também mostrou que o prognóstico da doença em pacientes no estágio B e com deleção do 18q era semelhante ao prognóstico de pacientes no estágio C. Por outro lado, pacientes com tumores no estágio B sem deleção do 18q apresentavam prognóstico semelhante ao de pacientes com tumores no estágio A. Esses achados indicam que a deleção do 18q está fortemente relacionada com uma pior sobrevida para os pacientes com CCR, sugerindo que, provavelmente, a proteína DCC tem um papel supressor tumoral⁵⁴

Pode-se dizer que a deleção do 18q, com a perda de um ou mais genes supressores tumorais,

dentre eles o DCC, constitui uma alteração genética tardia que contribui na carcinogênese colorretal através do comprometimento do funcionamento adequado dos mecanismos de adesão célula-célula, levando ao surgimento dos padrões anormais de diferenciação celular observados no CCR e exacerbando o surgimento de metástases pela perda de contatos celulares.

4) Gene p53

Descrito pela primeira vez em 1979, é o gene mais frequentemente associado com o câncer e já foi postulado seu papel na carcinogênese em vários tecidos^{68,72}. O p53 é o gene supressor tumoral clássico, agindo na regulação do desenvolvimento e crescimento celular^{37,61,135}. Localizado no *locus* 17p13, ele codifica uma proteína de 53kDa e 393 aminoácidos que tem a característica especial de ser expressa quando o DNA celular sofre algum tipo de dano, como aquele causado por luz ultravioleta, irradiação ou agentes quimioterápicos. A proteína p53 se liga então pelo seu domínio no terminal C ao local danificado do DNA e interrompe as células na fase G do ciclo celular, impedindo a progressão desta no ciclo de replicação até que o dano ao DNA tenha sido reparado⁶⁹. Caso isto não ocorra, induz a célula a entrar em apoptose, para impedir a divisão celular e a perpetuação de material genômico alterado na linhagem celular¹¹⁹.

Os mecanismos pelos quais a proteína p53 bloqueia o ciclo celular e induz a apoptose estão parcialmente elucidados. Após se ligar à região do DNA danificada, a proteína ativa então a transcrição da proteína p21 que inibe certas enzimas quinases necessárias para a célula passar para a fase S do ciclo celular¹³⁹. Com isso, bloqueia o ciclo celular. O mecanismo de ativação da apoptose parece estar relacionado à modulação dos *Bcl-2* e *Bax*. Para iniciar a apoptose a proteína p53 ativa o gene *Bax*, que promove a apoptose, e inibe o gene *Bcl-2*, que reprime a apoptose. São os níveis relativos destas duas proteínas que vão determinar se a célula vai ou não entrar em apoptose^{84,94}. Pode-se deduzir facilmente que uma mutação do p53 o deixaria inefetivo e permitiria a divisão celular com a passagem de material genômico alterado para as células-filhas.

Do mesmo modo que a perda do APC parece ser o evento crucial para o desenvolvimento de um adenoma, a perda do p53 é crucial para a sua transformação maligna. Foi demonstrado que 75% dos casos de CCR apresentavam perda de função dos dois alelos do p53, geralmente um por mutação e o outro por deleção^{39,136}. A explicação para isto era de que provavelmente a proteína p53 mutada agia de modo dominante negativo sobre a proteína

selvagem, impedindo sua ação adequada e dando uma vantagem de crescimento para estas células, estimulando a replicação celular e facilitando a ocorrência da deleção do outro alelo³⁹. A frequência de perda dos dois alelos, porém, era muito menor nos adenomas sem microinvasão (6%) e com microinvasão (24%) indicando ser a inativação dos alelos do p53 um evento bem tardio na carcinogênese colorretal¹³⁶.

Mutações do p53 parecem conferir um prognóstico pior para o doente, estando associadas a um risco 2,39 vezes maior de morte^{4,43,110}. Um dos primeiros estudos sobre prognóstico mostrou que 17% dos pacientes com CCR sem deleção do 17p morriam de doença metastática, enquanto que 49% dos que tinham deleção morriam de doença metastática⁵⁶. Essa associação mostrou-se independente de outros fatores como idade, estágio ou conteúdo celular de DNA. Portanto, a detecção da mutação do p53 por técnicas de imunohistoquímica ou PCR poderá servir de importante ferramenta para prognóstico, procedimento este que já vem sendo feito para tumores de cabeça e pescoço¹³.

5) Genes de reparo do DNA (Mismatch Repair- MMR)

Mutações somáticas podem surgir na célula de diversas maneiras, causadas por substâncias mutagênicas tanto endógenas como exógenas. Outra possível fonte de mutações somáticas são os erros cometidos pela DNA polimerase durante a replicação do DNA. Estima-se que esses erros ocorram a cada 10^5 bases, sendo que 99% são corrigidos pela própria enzima, deixando então um erro a cada 10^7 bases. É ativado então o sistema de Mismatch Repair (MMR) do DNA da célula, cuja principal função é o reconhecimento e correção de três tipos de erros: pareamento desigual de bases simples, bases quimicamente alteradas e alças na hélice. No primeiro tipo de erro, a DNA polimerase falha em parear um nucleotídeo na fita-padrão de DNA com o seu complemento correto na fita nova que está sendo sintetizada. No segundo tipo de erro, a polimerase incorpora bases modificadas quimicamente por mutágenos na fita nova que está sendo sintetizada. O terceiro tipo de erro ocorre quando a polimerase se vê face a uma sequência muito repetitiva de DNA, como muitos nucleotídeos A (polyA) ou muitos dinucleotídeos GA. Se a sequência da fita-padrão é altamente variada, a sequência da fita-nova só pode ser de um único jeito. Porém, se a fita padrão tem uma sequência muito repetitiva, a DNA polimerase pode errar e permitir a inclusão de um ou dois nucleotídeos extras. Se o sistema MMR falhar, começam a ocorrer mutações com uma frequência muito maior^{6,34,50,51,64,65,116}.

Muito antes de ser descoberto nos seres humanos, o sistema MMR já era estudado em organismos mais simples. Na bactéria *Escherichia coli* três proteínas constituíam o cerne do sistema: as proteínas codificadas pelos genes *mutS*, *mutL* e *mutH*³⁰. Também se encontraram genes homólogos aos das bactérias em leveduras, os genes *yMSH2*, *yMLH1* e *yPMS1*^{108,109}. Notou-se que mutações nos genes MMR tanto das bactérias como dos fungos levavam a um fenótipo de desestabilização.

Os microssatélites são regiões do genoma que consistem de repetições de um, dois ou três nucleotídeos. São altamente polimórficas quanto ao seu comprimento, de modo que uma mesma pessoa tem em geral dois alelos diferentes para cada microssatélite. No entanto, as sequências que flanqueiam as microssatélites são extremamente estáveis. Isso permitiu a análise do comprimento das microssatélites pela técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia de Polimerase)^{50,51,64,116,128}. Ao mesmo tempo que se analisavam mutações do sistema MMR em bactérias, percebeu-se que ocorriam fenômenos semelhantes com as sequências microssatélites em tumores humanos. Foi dado a este fenótipo o nome de Instabilidade de Microssatélites (MSI) ou fenótipo RER+ (*Replication Error Positive*) e constatado que estava associado ao HNPCC. Foi o primeiro passo na caracterização das alterações genéticas que levam ao HNPCC^{52,64,77,78,80,81,98,102,103,120,131,133}.

Iniciaram-se então os estudos para identificar os genes homólogos do sistema MMR no ser humano¹⁴⁴. O primeiro a ser identificado e clonado foi o *hMSH2*, localizado no cromossomo 2p, homólogo da *mutS*^{30,70}. Seguiu-se a identificação do gene *hMLH1*, no cromossomo 3p21, homólogo da *mutL*^{71,100}, e dos genes *hPMS1* e *hPMS2*, nos *locus* 2q31-33 e 7p22⁹⁰. Recentemente foi identificado o gene *hMSH6*, também conhecido como *hGTBP*, outro homólogo da *mutS*^{23,97}. Os estudos mais recentes têm focalizado a interação e função dos produtos protéicos dos genes MMR. Sabe-se que a proteína *hMSH2* aparentemente tem a função chefe no serviço de reconhecimento de erros de pareamento de bases. Ela age, porém, formando um dímero com a proteína *hMSH6*, para formar o complexo *hMSH2/hMSH6*, homólogo do complexo *mutS-alpha* encontrado na *E. coli*. A *hMLH1* também forma um dímero, se juntando à *hPMS2*, e este complexo vai agora interagir com o complexo formado pela *hMSH2/hMSH6*. A função do *hPMS1* ainda não foi devidamente elucidada.

Os genes MMR parecem seguir o padrão de gene supressor tumoral na definição de sua capacidade carcinogênica no HNPCC, requerendo uma segunda mutação somática após a mutação germinativa para que haja uma perda efetiva de função

e ocorra a carcinogênese. Em algumas linhagens celulares, porém, segue-se o padrão dominante-negativo, em que a presença de apenas uma mutação confere o fenótipo maligno à célula. Acredita-se que nestes casos a proteína mutada interaja com a proteína selvagem impedindo sua ação adequada.

5.1) Mutações dos genes MMR no HNPCC e no CCR esporádico

a) Mutação do *hMSH2* no HNPCC

O primeiro gene a ser identificado, sabe-se que apenas uma mutação na linhagem germinativa não é suficiente para causar o fenótipo RER+ requerendo uma mutação somática do alelo selvagem restante^{30,70}. Calcula-se que mutações neste gene estariam presentes em aproximadamente 40% das famílias com HNPCC^{73,79}.

b) Mutação do *hMLH1* no HNPCC

Semelhantemente ao *hMSH2*, a mutação em um único alelo não é suficiente para causar o fenótipo RER+¹⁰¹. As mutações em *hMLH1* foram detectadas em 24 a 47% dos pacientes com HNPCC^{44,63,79,93,146}. A maioria das mutações (70%) resulta numa proteína truncada¹⁴⁵.

c) Mutação do *hPMS1* e do *hPMS2* no HNPCC

Com função pouco conhecida, não são responsáveis por 10% das mutações encontradas em pacientes com HNPCC⁹⁰.

d) Mutação do *hMSH6/hGTBP* no HNPCC

Muito embora não tenham sido encontradas mutações germinativas em pacientes com HNPCC, mutações do gene induzidas *in vitro* levam as células afetadas a adquirirem o fenótipo maligno⁹⁹.

e) Mutação dos genes MMR no CCR esporádico

Os primeiros estudos constataram que 28% dos CCR esporádicos são RER+ com uma frequência maior nos tumores proximais do que nos distais. Em geral eram tumores com melhor prognóstico e menor probabilidade de terem perda de heterozigosidade nos cromossomos 5q, 17p e 18q¹³¹. Outro estudo correlacionou o fenótipo RER+ com características patológicas dos tumores, mostrando que os tumores com fenótipo RER+ eram em geral proximais, maiores e mais indiferenciados⁵⁷.

Para avaliar o momento da ocorrência da mutação, estudou-se a frequência do fenótipo RER+ em adenomas (3%) comparado com a frequência em CCR (16%), levando à conclusão que a mutação dos genes MMR não é um mecanismo importante na progressão inicial dos tumores. Conclui-se que a importância dos genes MMR no CCR esporádico se limita ao percentual (15%) de tumores que apresentam IMS e fenótipo RER+¹.

6) Gene MCC (*Mutated in Colon Cancer*)

A pesquisa pelo gene responsável pela PAF identificou um gene no cromossomo 5 *locus* q21 que foi denominado MCC⁵⁹. Um grande número de tumores de cólon esporádicos tiveram mutações no MCC identificadas. Entretanto, não foram encontradas mutações desse gene nas células germinativas em pacientes com PAF, eliminando a possibilidade de esse gene ser o responsável pela doença⁹². Muitos estudos demonstraram perda de heterozigose no *locus* MCC em adenocarcinomas colorretais, sugerindo que MCC é um gene supressor tumoral. Todavia, o MCC está ligado proximamente ao APC, tornando a interpretação difícil. De fato, um estudo de 21 tumores com perda de heterozigose do *locus* do MCC falhou em encontrar mutações no outro alelo restante em qualquer um dos tumores, e nenhum deles apresentava perda de heterozigose do MCC ou do APC separadamente²¹. Portanto, a função do MCC na oncogênese ainda é incerta.

A proteína MCC provavelmente funciona no controle do ciclo celular. Embora os níveis totais de MCC não se alterem conforme a célula entre ou passe pela fase S (de síntese de DNA), a proteína é fosforilada nessa fase. Adicionalmente, a expressão aumentada de MCC normal inibiu a entrada celular na fase S.

7) Gene CD44

A glicoproteína de superfície celular CD44 é um receptor de linfócitos com participação no endereçamento destes, mas também está presente em muitos outros tecidos. A sua provável função era, assim, de mediar as interações célula-célula e célula-substrato. Em 1991, foi isolado o cDNA de uma proteína que era homóloga ao CD44, usando um anticorpo monoclonal contra células de adenocarcinoma pancreático metastático de ratos⁴². Essa proteína, entretanto, era maior do que a expressada normalmente e foi demonstrada ser uma variante de *splicing* encontrada somente em tumores metastáticos. Em contraste com células-controle transfectadas somente com o vetor, quando essa variante era expressada em linhagem de células cancerosas não metastatizantes e injetadas em animais singênicos, os tumores desenvolviam metástases à distância. Subsequentemente, foi observado que um homólogo humano a essa variante de *splicing* de CD44 estava presente em muitos tecidos normais como a pele, mas ausente de outros como epitélio colônico normal. Entretanto, utilizando anticorpos específicos a essa variante, identificou-se uma expressão robusta em cânceres de cólon e mama e em pólipos adenomatosos^{47,113}. Nos pólipos,

a presença de CD44 estava associadas com áreas de displasia moderada a intensa.

O gene do CD44 é composto de 19 éxons em sua totalidade. A forma expressada em linfócitos é ausente dos éxons 7 a 14, que são processados fora durante o *splicing*. A variante do *splicing* insere alguns desses éxons e geralmente apresenta uma variedade de combinações, gerando um grande número de produtos na análise por eletroforese¹¹³. O éxon 10 tem sido implicado como o éxon mais comum que se correlaciona com o potencial metastático, mas outras variantes de éxons provavelmente também apresentam o seu papel.

Embora não se saiba ainda o mecanismo pelo qual a variante de CD44 possibilite a capacidade metastatizante, seu significado clínico reside na observação de que a expressão da variante do CD44 parece ser um indicador de prognóstico independente, prevendo uma incidência maior de recorrências e de mortalidade¹³⁷. Isso possibilita a identificação de subgrupos específicos de pacientes que poderiam se beneficiar de um manejo no pós-operatório mais agressivo, além de uma nova técnica de rastreamento¹³⁸.

8) C-myc

O gene c-myc é um membro da família de oncogenes, identificado primeiramente como um homólogo do oncogene transformante v-myc do vírus da mielocitomatose de aves. Em células mamárias, a expressão do c-myc em associação com H-ras resulta em transformação das células de cultura⁶⁶. C-myc codifica uma fosfoproteína de 62 kilodaltons localizada tanto no citoplasma como no núcleo, que se liga ao DNA e ativa a transcrição. A ativação do c-myc com o aumento do RNAm e da proteína mostraram estar associados com a proliferação celular em inúmeros tecidos. O mecanismo de expressão aumentada em algumas circunstâncias é devido ao rearranjo do gene com perda subsequente do controle normal da sua expressão gênica.

Na mucosa colônica normal, a expressão de c-myc ocorre no camada proliferativa, ou seja, no terço inferior das criptas^{82,114}. Aproximadamente 25% das células apresentam níveis elevados da proteína, detectada por imunocitoquímica primariamente dentro do núcleo. Níveis elevados de expressão de c-myc têm sido identificados frequentemente em células neoplásicas colorretais por análise tanto do RNAm^{121,123} quanto das proteínas^{82,114}. Em pólipos adenomatosos, a proteína também é encontrada nas camadas mais superficiais, refletindo a expansão já conhecida dos compartimentos proliferativos dessas lesões. Em adenocarcinomas, a expressão de c-myc é heterogênea, mas na maioria dos casos há ativação

aumentada do gene com maior quantidade de RNAm e proteína nas células malignizadas. O mecanismo de ativação de c-myc nessas neoplasias é desconhecido, porque somente uma minoria parece resultar de amplificação gênica^{2,25,123}. Somente uma associação da ativação de c-myc com câncer colorretal foi descrita e se há uma causalidade na oncogênese esta ainda deverá ser melhor determinada. Caso exista, a mutação parece ocorrer na fase inicial da seqüência adenoma-carcinoma.

9) Gene src

Este gene originalmente foi identificado como um homólogo celular do oncogene v-src (gene transformante do vírus do sarcoma de Rous). O c-src codifica um membro da família src de oncoproteínas. O seu produto, pp60, o primeiro protooncogene descoberto, é uma proteína tirosinoquinase. A expressão de pp60 ativado, assim como a de seu homólogo, é capaz de transformar células, aumentando a atividade proliferativa conforme cresce a atividade de pp60.

Estudos já mostraram atividade de pp60 aumentada em carcinomas de cólon e em pólipos pré-malignos^{9,17,18}. Os níveis de atividade se correlacionam com o estágio da neoplasia. Pólipos menores de 2 cm apresentam os mesmos níveis de atividade de células normais da mucosa, enquanto em pólipos a partir de 2 cm até lesões metastatizantes se observa uma correlação com o estágio da neoplasia e essa atividade¹³⁰. Também se notou correlação entre o grau da displasia e o grau histológico com a atividade de pp60¹⁸, sendo consistente a elevação dessa atividade de acordo com o grau de displasia em epitélios colônicos de pacientes com colite ulcerativa¹⁶. Níveis altos de atividade de pp60 foram ainda encontrados em cânceres moderadamente e bem diferenciados, mas em tumores pobremente diferenciados a atividade era similar a daquela do tecido normal¹⁴³. No tecido neoplásico, há um aumento moderado na quantidade de pp60, mas a sua atividade está aumentada. Assim, src está elevado em células de neoplasias colorretais em um estágio inicial, mas a sua função na proliferação epitelial ainda não está bem esclarecida, devendo atuar durante a mitose.

10) Gene da enzima COX-2

Estudos epidemiológicos demonstraram que o uso crônico da aspirina resulta em um risco reduzido de câncer colorretal³⁶ e que o tratamento com sulindac de pacientes com PAF causa regressão dos pólipos retais³⁵. Esses medicamentos, drogas

anti-inflamatórias não esteróides (DAINES), funcionam reduzindo os níveis teciduais de metabólitos do ácido araquidônico, ou eicosanóides. Duas enzimas são responsáveis pela síntese de eicosanóides: ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). A primeira é uma enzima presente na maioria dos tecidos. Em contraste, COX-2 não é expressa em condições normais, mas é induzida por citocinas inflamatórias, fatores de crescimento ou promotores de tumor. Como os níveis de COX-1 não se alteram significativamente, acredita-se que COX-2 apresente o principal papel na resposta inflamatória. As DAINES inibem não especificamente a atividade de COX-1 e COX-2.

Baseado em parte nos efeitos das DAINES nas neoplasias do cólon, foi investigado o efeito da COX na carcinogênese colorretal. Os níveis de Prostaglandina E2 estão elevados significativamente em CCR e pólipos, embora não em todos os tumores^{107,111}. Os níveis da COX-2 são muito baixos no epitélio colônico normal, mas apresentam-se elevados em CCR e pólipos²⁴. Em todos os estudos, não foram identificados diferenças significativas nos níveis de COX-1 entre o epitélio neoplásico e o normal. Esse estudo demonstra uma associação mas não um papel causal da COX-2 no câncer colorretal. Três estudos subsequentes demonstraram uma função direta da enzima. Transformações permanentes da linhagem de célula epitelial intestinal de rato expressando COX-2 foram gerados¹³². Quando as células cresciam na laminina ou em um modelo de membrana basal, houve maior proliferação e adesão nas células expressando COX-2. Adicionalmente, quando medido diretamente, houve comparativamente menor apoptose. Todas essas observações foram revertidas com o uso do inibidor sulindac. Todos esses achados possibilitaram a conclusão de que 5em um modelo de cultura de tecidos a expressão da COX-2 resultou em menor diferenciação, aumento da proliferação e da adesão célula-matriz e menor apoptose, todas essas manifestações fenotípicas sendo propriedades típicas de neoplasia.

Recentemente, em um modelo de PAF em rato Min¹⁰ demonstrou-se que COX-2 está envolvida na carcinogênese. Observou-se que a proteína COX-2 e os níveis de PGE2 estavam elevados na mucosa normal desses animais heterozigotos, em comparação com a de ratos sem alteração gênica para PAF. Adicionalmente, os níveis de apoptose estavam diminuídos no terço superior do vilão do epitélio. Quando tratados com sulindac, todas essas anormalidades foram revertidas e próximo da totalidade da formação dos tumores foram inibidas nesses animais. Em outra pesquisa⁹⁶, estudaram-se camundongos com knockout, heterozigotos para APC e heterozigotos ou homozigotos para COX-2. Com expressão diminuída para COX-2, esses animais

desenvolveram menos pólipos intestinais e colônicos, sendo que aqueles homozigotos para o knockout de COX-2 apresentaram um decréscimo de 86% em comparação com os controles. Adicionalmente, todos os pólipos eram significativamente menores como um resultado da redução do COX-2. Por sua vez, quando os animais heterozigotos para APC, mas apresentando COX-2 normal, foram tratados com um inibidor específico da atividade enzimática de COX-2, apresentaram 50 a 60% de redução no número de pólipos, em comparação com uma redução de 26% quando tratados com sulindac. Esses estudos demonstraram que COX-2 apresenta um impacto direto

no desenvolvimento de pólipos colônicos e cânceres. Deve-se ressaltar que, apesar de COX-2 estar presente predominantemente na lâmina própria das células do vilos e pólipos nesse estudo, nos cânceres humanos estava localizado nas células cancerosas derivadas do epitélio¹¹⁸. A diferença em relação aos pólipos humanos para os de rato pode ser devido a diferenças entre espécies ou do estudo de PAF em relação a tumores esporádicos. Entretanto, é inegável que a expressão de COX-2 parece apresentar um papel significativo na via da carcinogênese colorretal.

Os genes envolvidos no CCR estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 Genes envolvidos na carcinogênese colorretal.

Categoria	Nome	Função do gene na patogênese do câncer
Supressores tumorais	APC	Sua perda afeta a regulação do ciclo celular e da apoptose; controla os níveis citoplasmáticos da proteína b-catenina, que funciona como um ativador da transcrição de DNA.
	DCC	Molécula de adesão celular; perda de função é estímulo para comportamento metastático
	p53	Regula o ciclo celular e a apoptose após dano ao DNA; perda de função leva à replicação celular mesmo em face de mutações no DNA.
	MCC	Função desconhecida; efeito da perda de função desconhecido
Oncogenes	K-ras	Proteína de ligação com o GTP e intermediária na via de sinalização de fatores de crescimento; mutação leva à sua ativação constante e estimulação irrefreada à replicação do DNA
	src	Enzima tirosina quinase; tem atividade elevada em adenomas e carcinomas, porém os mecanismos que levam à sua ativação são desconhecidos
	c-myc	Ativador de transcrição; expressão aumentada em neoplasias do cólon, porém os mecanismos de amplificação são desconhecidos
Genes Mismatch Repair	hMSH2 hMLH1 hMSH6 hPMS1 hPMS2	Fazem parte do sistema de reparo do DNA; perda leva ao fenótipo de instabilidade de microssatélites e à hipermutabilidade do DNA
Outros Genes	CD44v	Glicoproteína de superfície celular; molécula de adesão celular relacionada com doença metastática.
	COX-2	Gene da enzima Ciclooxigenase-induzível; inibe diferenciação celular no epitélio intestinal e diminui a apoptose.

CONCLUSÃO

A elucidação completa dos mecanismos genéticos envolvidos na patogênese molecular do CCR é um fator de grande relevância na busca da diminuição tanto da mortalidade do CCR, que

permanece praticamente inalterada nas últimas décadas, quanto no impacto social imposto por tal doença. Ao passo que o conhecimento obtido através da genética avança, é possível desenvolver métodos

de investigação e diagnóstico mais sensíveis e específicos, como o rastreamento para populações de alto risco. Do mesmo modo, nos próximos anos o conhecimento genético deverá sedimentar-se como um dos fatores de maior peso na decisão terapêutica e na abordagem do paciente com tal patologia. Ademais, a elaboração de tratamentos alternativos à cirurgia, um procedimento invasivo com seu risco inerente, também parece possível através da terapia

gênica. Portanto, é inegável a importância para clínicos e cirurgiões da área digestiva entenderem os mecanismos genéticos envolvidos na gênese do CCR, uma vez que toda conduta médica em relação a essa doença certamente, num futuro não distante, apresentará como base o quadro genético. Familiarizar-se com a Genética do Câncer Colorretal e os avanços nessa área torna-se, portanto, imperativo para esses profissionais.

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE, Martino RB. Genetics of colorectal cancer. Rev Med (São Paulo) 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

ABSTRACT: Colorectal cancer (CRC) is one of the most important neoplasms not only for its prevalence but also for its incidence, accounting for 10% of all the neoplasms in the USA. However, its mortality remained unaffected in the last 50 years. Since Morson described the adenoma-carcinoma sequence for the first time in 1978, the elucidation of the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of CRC became intensively studied and many progresses were obtained. Several genes, like APC, DCC and p53, among others, were identified as participants of the adenoma-carcinoma sequence. They are involved in the multi-step process of the tumorigenesis, where the accumulation of genetic mutations in unstable cells represents the most important factor, which ends up rising the cancer. There are two basic types of CRC: the sporadic, that accounts for 85% of the total of cases of CRC; and the familial, with about 15% of the cases, which includes the Adenomatous Polyposis of the Colon (APC) and the Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC). The mechanisms of action of such genes are now being described and research is being made to determine their prognostic value. One expects that the complete elucidation of such mechanisms will allow a decrease not only on the mortality, but also on the social impact imposed by such disease. Moreover, alternative treatments for surgery seem possible by gene therapy. Therefore, it is imperative for gastrointestinal surgeons and physicians to be familiarized with the genetics of the colorectal cancer.

KEYWORDS: Colorectal neoplasms/genetics; Colorectal neoplasms/epidemiology; Sequence/genetics; Adenomatous polyposis coli/genetics; Adenocarcinoma/epidemiology; Adenocarcinoma/genetics; Mutation/genetics.

REFERÊNCIAS

1. Aaltonen LA, Peltomaki P, Mecklin JP, Järvinen H, Jass JR, Green JS, Lynch HT, Watson P, Tallqvist G, Juhola M, et al. Replication errors in benign and malignant tumors from hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients. *Cancer Res* 1994;54(7):1645-8.
2. Albanese I, Albert M, Bazan V, Russo A, Baiamonte S, Migliavacca M, Bazan P, La Farina M. Structural analysis of c-myc in human sporadic colorectal carcinomas. *Anticancer Res* 1994;14:1103-6.
3. Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long term risk of colorectal cancer after excision of retosigmoid adenomas. *N Engl J Med* 1992;326:658-62.
4. Auvinen A, Isola J, Visakorpi T, Koivula T, Virtanen S, Hakama M. Overexpression of p53 and long term survival in colon carcinoma. *Br J Cancer* 1994;70:293-6.
5. Barbacid M. ras genes. *Ann Rev Biochem* 1987;56:779-827
6. Barnes DE, Lindahl T, Sedgwick B. DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:424-33.
7. Baserga R, Stein GS, Denhardt DT, Giordano A: The molecular basis of cell cycle and growth control. New York: Wiley, Johns & Sons; 1998.
8. Benhattar J, Losi L, Chaubert P, Givel JC, Costa J. Prognostic significance of K-ras mutations in colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1993;104:1044-8.
9. Bérout C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucl Acid Res* 1996;24:121-4.
10. Boolbol SK, Dannenberg AJ, Chadburn A, Martucci C, Guo XJ, Ramonetti JT, Abreu Goris M, Newmark HL, Lipkin ML, DeCosse JJ, Bertagnolli MM. Cyclooxygenase -2 overexpression and tumor formation are blocked by sulindac in a murine model of adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1996;56:2556-60.
11. Bos H, Fearon ER, Hamilton SR, Verlaan de Vries M, van Boon JH, van der Eb AJ, Vogelstein B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987;327:293-7
12. Bos JL. p21 ras: an oncoprotein functioning in growth factor-induced signal transduction. *Eur J Cancer* 1995;31A:1051-4.

13. Brennan JA, Mao L, Hruban RH, Boyle JO, Eby YJ, Koch WM, Goodman SM, Sidransky D. Molecular assessment of histopathological staging in squamous cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 1995;332:429-35.
14. Browne SJ, Willians AC, Hague A, Butt AJ, Paraskeva C. Loss of APC protein expressed by human colonic epithelial cells and the appearance of a low-molecular-weight form is associated with apoptosis in vitro. *Int J Cancer* 1994;59:56-64.
15. Capella G, Cronaues-Mitra S, Peinado MA, Peruch M. Frequency and spectrum of mutations at codons 12 and 13 of the c-K-ras gene in human tumors. *Environ Health Perspect* 1991;93:125-31.
16. Cartwright CA, Coad CA, Egbert BM. Elevated c-Src tyrosine kinase activity in premalignant epithelia in ulcerative colitis. *J Clin Invest* 1994;93:509-15.
17. Cartwright CA, Kamps MP, Meisler AI, Pipas JM, Eckhart W. pp60^{c-src} activation in human colon carcinoma. *J Clin Invest* 1989;83:2025-33.
18. Cartwright CA, Meisler AI, Eckhart W. Activation of the pp60^{c-src} protein kinase is an early event in colonic carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:558-62.
19. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma-carcinoma sequence. *Cancer* 1992;70:1727-31.
20. Cowin P. Unravelling the cytoplasmic interactions of the cadherin superfamily. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:10759-61.
21. Curtis LJ, Bubb VJ, Gledhill S, Morris RG, Bird CC, Wyllie AH. Loss of heterozygosity of MCC is not associated with mutation of the retained allele in sporadic colorectal cancer. *Hum Mol Genet* 1994;3:443-6.
22. de Vries JE, ten Kate J, Bosman FT. p21 ras in carcinogenesis. *Pathol Res Pract* 1996;192:658-68.
23. Drummond JT, Li G-M, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cell. *Science* 1995;268:1909-12.
24. Eberhart CE, Coffey RJ, Radhika A, Giardiello FM, Ferrenbach S, DuBois RN. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression in human colorectal adenomas and adenocarcinomas. *Gastroenterology* 1994;107:1183-88.
25. Erisman MD, Scott JK, Watt RA, Astrin SM. The c-myc protein is constitutively expressed at elevated levels in colorectal carcinoma cell lines. *Oncogene* 1988;2:367-78.
26. Fearon ER, Cho KR, Nigro JM, Kern SE, Simons JW, Rupert JM, Hamilton SR, Preisinger AC, Thomas G, Kinzler KW, et al. Identification of a chromosome 18q gene that is altered in human colorectal cancers. *Science* 1990;247:49-56.
27. Fearon ER, Hamilton SR, Vogelstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. *Science* 1987;238:193-7.
28. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
29. Fearon ER. Molecular genetics of colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci* 1995;768:101-10.
30. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
31. Finklestein SD, Sayegh R, Bakker A, Swalsky PA. Determination of tumor aggressiveness in colorectal cancer by K-ras-2 analysis. *Arch Surg* 1993;128:526-31.
32. Finklestein SD, Sayegh R, Christensen S, Swalsky PA. Genotypic classification of colorectal adenocarcinoma. *Cancer* 1993;71:3827-38.
33. Forrester K, Almoguerra C, Han K, Grizzle WE, Percuho M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colorectal tumorigenesis. *Nature* 1987;327:298-303.
34. Friedberg EC, Walker GC, Siede W. DNA repair and mutagenesis. Washington: ASM Press; 1995.
35. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, Piantadosi, Hyland LM, Celano P, Booker SV, Robinson CR, Offerhaus GJ. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993;328:1313-6.
36. Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FC. Aspirin and the risk of colorectal cancer in human. *N Engl J Med* 1995;333:609-14.
37. Gottlieb TM, Oren M. p53 in growth control and neoplasia. *Biochim Biophys Acta* 1996;128:77-102.
38. Goyette MC, Cho K, Fasching CL, Levy DB, Kinzler KW, Paraskeva C, Vogelstein B, Stanbridge EJ. Progression of colorectal cancer is associated with multiple tumor suppressor gene defects but inhibition of tumorigenicity is accomplished by correction of any single defect via chromosome transfer. *Mol Cell Biol* 1992;12:1387-95.
39. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: Clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
40. Groden J, Gelbert L, Thliveris A, Nelson L, Robertson M, Joslyn G, Samowitz W, Spirio L, Carlson M, Burt R, et al. Mutational analysis of patients with adenomatous polyposis: Identical inactivating mutations in unrelated individuals. *Am J Hum Genet* 1993;52:263-72.
41. Groden J, Thliveris A, Samowitz W, Carlson M, Gelbert L, Albertsen H, Joslyn G, Stevens J,

- Spirio L, Robertson M, et al. Identification and characterization of the familial adenomatous polyposis coli gene. *Cell* 1991;66:589-600.
42. Günthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussmann Y, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 1991;65:13-24.
43. Hamelin R, Laurent-Puig P, Olschwang S, Jegou N, Asselain B, Remvikos Y, Girodet J, Salmon RJ, Thomas G. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. *Gastroenterology* 1994;106:42-8.
44. Han H-J, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair genes hMLH1 and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 1995;4:237-42.
45. Hauser IJ, Weller CV. A further report of the cancer family of Warthin. *Am J Cancer* 1936;27:434-49.
46. Hedrick L, Cho KR, Fearon ER, Wu TC, Kinzler KW, Vogelstein B. The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis. *Genes Dev* 1994;8:1174-83.
47. Heider K-H, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol* 1993;120:227-33.
48. Herrera L, Kakati S, Gibas L, Pietrzak E, Sandberg AA. Gardner syndrome in a man with an interstitial deletion of 5q. *Am J Med Genet* 1986;25:473-6.
49. Hill MJ, Morson BC, Bussey HJ. A etiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. *Lancet* 1978;1:245-7.
50. Hoejmakers JH. Nucleotide excision repair I: from *E. coli* to yeast. *Trends Genet* 1993;9:173-77.
51. Hoejmakers JH. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 1993;9:211-7.
52. Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 1993;363:558-61.
53. Jass JR. Colorectal adenoma progression and genetic change: Is there a link? *Ann Med* 1995;27:301-6.
54. Jen J, Kim H, Piantadosi S, Liu ZF, Levitt RC, Sistonen P, Kinzler KW, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic losses of chromosome 18q and prognosis in colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;331:213-21.
55. Joslyn G, Carlson M, Thliveris A, Albertsen H, Gelbert L, Samowitz W, Groden J, Stevens J, Spirio L, Robertson M. Identification of deletion mutations and three new genes at the familial polyposis locus. *Cell* 66: 601-13, 1991.
56. Kern SE, Fearon ER, Tersmette KWF, Enterline JP, Leppert M, Nakamura Y, White R, Vogelstein B, Hamilton SR. Allelic loss in colorectal carcinomas. *JAMA* 1989;261:3099-103.
57. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-56.
58. Kinzler KW, Nilbert MC, Su L, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hedge P, McKechnie D, et al. Identification of FAP locus gene from chromosome 5q21. *Science* 1991;253:661-5.
59. Kinzler KW, Nilbert MC, Vogelstein B, Bryan TM, Levy DB, Smith KJ, Preisinger AC, Hamilton SR, Hedge P, Markham A, et al. Identification of a gene located at chromosome 5q21 that is mutated in colorectal cancers. *Science* 1991;251:1366-70.
60. Knudson AG. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. *Cancer Res* 45: 1437-43, 1985.
61. Ko LJ, Prives C. p53: Puzzle and paradigm. *Genes Dev* 1996;10:1054-72.
62. Kobayashi M, Watanabe H, Ajioka Y, Honma T, Asakura H. Effect of K-ras mutations on morphogenesis of colorectal adenomas and early cancers. *Hum Pathol* 1996;27:1042-9.
63. Kolodner RD, Hall NR, Lipford JM, Kane MF, Morrison PT, Finan PJ, Burn J, Chapman P, Earabino C, Merchant E, et al. Structure of the human MLH1 locus and analysis of a large hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma kindred for MLH1 mutations. *Cancer Res* 1995;55:242-8.
64. Kolodner RD. Mismatch repair: Mechanism and relationship to cancer susceptibility. *TIBS* 1995;20:397-401.
65. Kornberg A, Baker TA. DNA replication. 2nd ed. New York: W.H. Freeman; 1992.
66. Land H, Parada LF, Weinberg RA. Tumorigenic conversion of primary embryos fibroblast requires at least two cooperating oncogenes. *Nature* 1983;304:596-601.
67. Landis SH, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer statistics: 1998. *CA Cancer J Clin* 1998;48:6-29.
68. Lane DP, Crawford LV. T antigen is bound to a host protein in SV40 transformed cells. *Nature* 1979;278:261-3.
69. Lane DP. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature* 1992;358:15-6.
70. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.

71. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993;5:279-82.
72. Linzer DIH, Levine AJ. Characterization of a 54K dalton cellular tumor antigen present in SV40-transformed and uninfected embryonal carcinoma cells. *Cell* 1979;17:43-52.
73. Liu B, Parsons RE, Hamilton SR, Petersen GM, Lynch HT, Watson P, Markowitz S, Willson JK, Green J, de la Chapelle A, et al. hMSH2 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. *Cancer Res* 1994;54:4590-4.
74. Losi L, Roncucci L, di Gregorio C, de Leon MP, Benhattar J. K-ras and p53 mutations in human colorectal aberrant crypt foci. *J Pathol* 1996;178:259-63.
75. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family "G" revisited: 1895-1970. *Cancer* 1971;27:1505-11
76. Lynch H, Lynch J: Genetics of colonic cancer. *Digestion* 1998;59:481-92.
77. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, molecular and genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). *Int J Cancer* 1996;69:38-43.
78. Lynch HT, Smyrk T, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: An updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-49.
79. Maliaka YK, Chudina AP, Belev NF, Alday P, Bochkov NP, Buestedde JM. CpG dinucleotides in the hMSH2 and hMLH1 genes are hotspots for HNPCC mutations. *Hum Genet* 1996;97:251-5.
80. Marra G, Boland CR. DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:755-72.
81. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114-25.
82. Melhem MF, Meisler AI, Finley GG, Bryce WH, Jones MO, Tribby II, Pipas JM, Koski RA. Distribution of cells expressing myc proteins in human colorectal epithelium, polyps, and malignant tumors. *Cancer Res* 1992;52:5853-64.
83. Miller JR, Moon RT. Signal transduction through β -catenin and specification of cell fate during embryogenesis. *Genes Dev* 1996;10:2527-39.
84. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell* 1995;80:293-9.
85. Miyoshi Y, Ando H, Nagase H, Nishisho I, Horii A, Miki Y, Mori T, Utsunomiya J, Baba S, Petersen G: Germ-line mutations of the APC gene in 53 familial adenomatous polyposis patients. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4452-6.
86. Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, Aoki T, Miki Y, Mori T, Nakamura Y. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992;1:229-33.
87. Morin PJ, Sparks AB, Korinek V, Barker N, Clevers H, Vogelstein B, Kinzler KW. Activation of beta-catenin- Tcf signaling in colon cancer by mutations in beta-catenin or APC. *Science* 1997;275:1787-90.
88. Muleris M, Salmon RJ, Zafrani B, Girodet J, Dutrillaux B. Consistent deficiencies of chromosome 18 and the short arm of chromosome 17 in eleven cases of human large bowel cancer; A possible recessive determinism. *Ann Genet (Paris)* 1985;28:206-13.
89. Munemitsu S, Albert I, Souza B, Rubinfeld B, Polakis P Regulation of intracellular β -catenin levels by the adenomatous polyposis coli (APC) tumor suppressor protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:3046-50.
90. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wey YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
91. Nigam AK, Savage FJ, Boulos PB, Stamp GW, Liu D, Pignatelli M. Loss of cell-cell and cell-matrix adhesion molecules in colorectal cancer. *Br J Cancer* 1993;68:507-14.
92. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, Miki Y, Ando H, Horii A, Koyama K, Utsunomiya J, Baba S, Hedge P. Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991;253:665-9.
93. Nystrom-Lahti M, Parsons R, Sistonen P, Pilkkhänen L, Aaltonen LA, Leach FS, Hamilton SR, Watson P, Bronson E, Fusaro R, et al. Mismatch repair genes on chromosome 2p and 3p account for a major share of hereditary non-polyposis colon cancer (HNPCC) families evaluable by linkage. *Am J Hum Genet* 1994;55:659-65.
94. Oltvai ZN, Milliman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 1993;74:609-19.
95. Ookawa K, Sakamoto M, Hirohashi S, Yoshida Y, Sugimura T, Terada M, Yokota J. Concordant p53 and DCC alterations and allelic losses on chromosomes 13q and 14q associated with liver metastases of colorectal cancer. *Int J Cancer* 1993;53:382-7
96. Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM Suppression of intestinal polyposis in Apc knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 1996;87:803-9.

97. Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, Darrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J. GTBP, a 160 kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995;268:1912-4.
98. Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. *Hum Mut* 1997;10:89-99.
99. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, Darrigo A, Markowitz S, Wissson JK, Kinzler KW, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science* 1995;268:1915-7
100. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
101. Parsons R, Li GM, Longley MJ, Fang WH, Papadopoulos N, Jen J, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogenstein B, Modrich P. Hypermutability and mismatch repair deficiency in RER+ tumor cells. *Cell* 1993;75:1227-36.
102. Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10065-9.
103. Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:339-48.
104. Presciuttini S, Varesco L, Sala P, Gismondi V, Rosseti C, Bafico A, Ferrara GB, Bertaiolo L. Age of onset in familial adenomatous polyposis: Heterogeneity within families and among APC mutations. *Ann Hum Genet* 1994;58:331-42.
105. Pretlow TP, Brasitus TA, Fulton NC, Cheyer C, Kaplan EL. K-ras mutations in putative preneoplastic lesion in human colon. *J Natl Cancer Inst* 1993;85:2004-7
106. Pro-Onco. Estimativa da incidência e mortalidade por Câncer no Brasil. Rio de Janeiro, 1996, 19p.
107. Pugh S, Thomas GAO. Patients with adenomatous polyps and carcinoma have increased colonic mucosal prostaglandin E2. *Gut* 1994;35:675-8.
108. Reenan RA, Kolodner RD. Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and MSH2 genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* 1992;132:975.
109. Reenan RA, Kolodner RD. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics* 1992;132:963-73.
110. Remvikos Y, Tominaga O, Hammel P, Laurent-Puig P, Salmon RJ, Dutrillaux B, Thomas G. Increased p53 protein of colorectal tumours correlates with poor survival. *Br J Cancer* 1992;66:758-64.
111. Rigas B, Goldman IS, Levine L. Increased eicosanoid levels in human colon cancer. *J Lab Clin Med* 1993;122:518-23.
112. Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. Pathologic basis of disease. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.
113. Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, Dutrillaux B, Lefrançois D, Theillet C. CD44 expression patterns in breast and colon tumors: A PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer* 64: 347-54, 1995.
114. Royds JA, Sharrard RM, Wagner B, Polacz SV. Cellular localization of c-myc product in human colorectal neoplasia. *J Pathol* 1992;166:225-33.
115. Rubinfeld B, Souza B, Albert I, Müller O, Chamberlain SH, Masiarz FR, Munemitsu S, Polakis P. Association of the APC gene product with β -catenin. *Science* 1993;262:1731-4.
116. Sancar AZ, Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 1988;57:29-67
117. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996;110:682-7
118. Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T. Expression of cyclooxygenase -1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:3785-9.
119. Shaw P, Bovey R, Tardy S, Sahli R, Sordat B, Costa J. Induction of apoptosis by wild type p53 in a human colon tumor-derived cell-line. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:4495-9.
120. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosian S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal tumorigenesis that persists after transformation. *Nat Genet* 1994;6:273-81.
121. Sikora K, Chan S, Evan G, Gabra H, Markham N, Stewart J, Watson J. c-myc oncogene expression in colorectal cancer. *Cancer* 1987;59:1289-95.
122. Smith AJ, Stern HS, Penner M, Hay K, Mitri A, Bapat BV, Gallinger S. Somatic APC and K-ras mutations in aberrant crypt foci from human colons. *Cancer Res* 1994;54:5527-30.
123. Smith DR, Myint T, Goh H-S. Over-expression of the c-myc proto-oncogene in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 1993;68:407-13.

124. Smith KJ, Johnson KA, Bryan TM, Hill DE, Markowitz S, Willson JK, Paraskeva C, Petersen GM, Hamilton SR, Vogelstein B, et al. The APC gene product in normal and tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:2846-50.
125. Solomon E, Voss R, Hall V, Bodmer WF, Jass JR, Jeffreys AJ, Lucibello FC, Patel I, Rider SH. Chromosome 5 allele loss in human colorectal carcinomas. *Nature* 1987;328:616-9.
126. Span M, Moerkerk PTM, De Goeij AF, Arends JW. A detailed analysis of K-ras mutations in relation to tumor progression and survival in colorectal cancer patients. *Int J Cancer* 1996;69:241-5.
127. Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993;75:951-7
128. Strand M, Prolia TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993;365:274-6.
129. Su L-K, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science* 1993;262:1734-7
130. Talamonti MS, Roh MS, Curley AS, Gallick GE. Increase in activity and level of pp60 in progressive stages of colorectal cancer. *J Clin Invest* 1993;91:53-60.
131. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-9.
132. Tsujii M, Dubois RN. Alterations in cellular adhesion and apoptosis in epithelial cells overexpressing prostaglandin endoperoxidase synthase 2. *Cell* 1995;83:493-501.
133. Umar A, Boyer JC, Thomas DC, Nguyen DC, Risinger JI, Boyd J, Ionov Y, Perucho M, Kunkel TA. Defective mismatch repair in extracts of colorectal and endometrial cancer cell lines exhibiting microsatellite instability. *J Biol Chem* 1994;269:14367-70.
134. Vasen HF, Walson P, Mechlin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch Syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
135. Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem* 1996;42:858-68.
136. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988;319:525-32.
137. Yamaguchi K, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K. Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 1996;14:1122-7
138. Yoshida K, Sugino T, Bolodeoku J, Warren BF, Goodison S, Woodman A, Toge T, Tahara E, Tarin D. Detection of exfoliated carcinoma cells in colonic luminal washings by identification of deranged patterns of expression of the CD44 gene. *J Clin Pathol* 1996;49:300-5.
139. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55:5187-90.
140. Warthin AS. Hereditary with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-193. *Arch Intern Med* 1913;12:546-55.
141. Warthin AS. The further study of a cancer family. *J Cancer Res* 1925;9:279-86.
142. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-85.
143. Weber TK, Steele G, Summerhayes JC. Differential pp60 activity in well and poorly differentiated human colon carcinomas and cell lines. *J Clin Invest* 1992;90:815-21.
144. Wevrick R, Buchwald M: Mammalian DNA-repair genes. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:470-4.
145. Wijnen J, Khan PM, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van der Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. *Am J Hum Genet* 1996;58:300-7
146. Wijnen J, Vasen H, Khan PM, Menko FH, van der Klift H, van Leeuwen C, et al. Seven new mutations in hMSH2, na HNPCC gene, identified by denaturing gradient-gel electrophoresis. *Am J Hum Genet* 1995;56:1060-6.
147. Willis RA. The spread of tumors in the human body. 3rd ed. London: Butterworth; 1952.
148. Winaer SJ, Fletcher RH, Miller L, Godlee F, Stolar MH, Mulrow CD, et al. Colorectal cancer screening: Clinical guidelines and rationale. *Gastroenterology* 1997;112:594-642.