

INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE – MSI NOS MARCADORES (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) NO CÂNCER DE RETO

Microsatellite instability – MSI markers (BAT26, BAT25, D2S123, D5S346, D17S250) in rectal cancer

Grazielle Moraes **LOSSO**¹, Roberto da Silveira **MORAES**², Arthur C. **GENTILI**³, Iara Tabora **MESSIAS-REASON**¹

Trabalho realizado no ¹Laboratório de Imunopatologia Molecular, ²Serviço de Cirurgia do Aparelho Digestivo e ³Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de Clínicas da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

RESUMO – Racional - O câncer colorretal tem importante componente genético. Os microsatélites são considerados marcadores fenotípicos de prognóstico, resposta terapêutica e de identificação de pacientes com mutação nos genes de reparo do DNA. **Objetivos** – Avaliar o perfil molecular dos tumores submetidos à microcirurgia endoscópica transanal (TEM) para tratamento do câncer de reto. **Método** – Foram selecionados 38 espécimes avaliados segundo o estadiamento patológico. Foram escolhidas amostras da região tumoral e realizada dissecação e extração do DNA. Os tumores colorretais foram testados para instabilidade de microsatélite – MSI utilizando um painel composto de cinco marcadores (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S2720), técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR). **Resultados** – Nos 38 casos observou-se que 63% eram do sexo masculino e 47% feminino com média de idade de 58,4 anos. Em relação ao tipo tumoral 58% eram adenomas, sendo 24% adenomas de baixo grau e 76% de alto grau; 42% eram carcinomas. Quanto à profundidade de ressecção, verificou-se que 80% dos casos incluíam a gordura perirretal e 20% até a muscular própria. O microsatélite com maior frequência de amplificação foi o BAT26 (100%) e o menor D17S2720 (85,4%). Dezesesseis casos (42%) apresentaram MSI; eram dez carcinomas, dois adenomas de baixo grau e quatro de alto grau. Vinte e dois casos (68%) tinham microsatélite estáveis – MSS. A perda alélica dos marcadores de microsatélites foi estatisticamente significativa nos casos de carcinoma em relação a adenomas. O microsatélite com maior frequência de amplificação foi o BAT26 (100%) e o menor D17S2720 (85,4%); 16 casos (42%) apresentaram instabilidade de microsatélite – MSI. Desses, dez eram carcinomas, dois adenomas de baixo grau e quatro de alto grau; 22 casos (58%) apresentaram microsatélite estáveis – MSS. **Conclusão** - A instabilidade de microsatélite (MSI-H) foi significativamente associada com carcinomas retais, confirmando sua utilização como marcador prognóstico na carcinogênese retal.

DESCRITORES - Instabilidade de microsatélites. Marcadores biológicos de tumor. Microcirurgia endoscópica transanal.

Correspondência:

Grazielle Moraes Losso;
e-mail: graziele.losso@terra.com.br

Fonte de financiamento: CNPq, CAPES, Programa de Medicina Interna e da Saúde da Universidade Federal do Paraná
Conflito de interesses: não há

Recebido para publicação: 27/03/2012

Aceito para publicação: 22/08/2012

HEADINGS – Microsatellite instability. Tumor markers, biological. Transanal endoscopic microsurgery.

ABSTRAT – Background - Colorectal cancer has an important genetic component. Microsatellites are considered phenotypic markers of prognosis, therapeutic response and identify patients with mutations in DNA repair genes. **Aim** – To evaluate the molecular profile of tumors underwent to transanal endoscopic microsurgery – TEM in surgical treatment of rectal cancer. **Method** – Thirty eight surgical specimens were evaluated according to pathological staging and the region of the tumor were dissected and submitted to DNA extraction. The colorectal tumors were tested for microsatellite instability – MSI using a panel of five markers (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, and D17S2720) technique of Polymerase Chain Reaction (PCR). **Result** – From total 63% were male and 47% female, with mean age of 58.4 years. In relation to tumor type adenomas were 58%, 24% low-grade adenomas and 76% high grade; 42% were carcinomas. The depth of resection 80% included the rectal perirenal fat and 20% the muscularis propria. The most frequent microsatellite amplification was BAT26 (100%) and lowest D17S2720 (85.4%). Sixteen patients (42%) were MSI, ten were carcinomas, two low grade adenomas and four high grade. Twenty-two cases (68%) showed microsatellite stable – MSS. The allelic loss of microsatellite markers was statistically significant in cases of carcinoma in relation to adenomas. The most frequent microsatellite amplification was BAT26 (100%) and lower D17S2720 (85.4%), 16 patients (42%) had microsatellite instability – MSI thereof ten were carcinomas, two low grade adenomas, four high-grade adenomas and 22 cases (58%) were microsatellite stable – MSS. **Conclusion** - Microsatellite instability (MSI-H) was significantly associated with rectal carcinomas, confirming its use as a prognostic marker in colorectal carcinogenesis.

INTRODUÇÃO

O mapeamento do genoma humano aliado ao desenvolvimento de novas técnicas moleculares permitiu não só a descoberta de genes de predisposição genética ao câncer, como também a possibilidade de análise genômica em larga escala. O desenvolvimento do câncer resulta de uma série de etapas envolvendo mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações gênicas e instabilidade genômica, além de mecanismos epigenéticos. Entre os múltiplos genes envolvidos nesse processo, destacam-se os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e relacionados ao reparo do DNA^{18,25}.

O DNA é molécula que sofre frequentemente alterações através de perdas de segmentos, mutações ocorridas durante o processo de divisão celular. Para corrigir tais alterações dispõe-se de algumas proteínas com função de realizar os reparos necessários para manter a integridade do DNA. Essas proteínas são produzidas a partir de alguns genes conhecidos como de reparo (mismatch repair genes – MMR) e sua função é exercida de forma contínua, preservando os tecidos celulares^{12,13}. A instabilidade de microssatélite – MSI é fruto da inativação das proteínas de reparo do DNA e se constitui na base molecular do câncer colorretal hereditário não polipóide – HNPCC. Seis genes relacionados com o reparo do DNA estão envolvidos no MMR (mismatch repair genes), tais como: hMLH1 (Gene Human mut-L Homologue 1), hMSH2 (Gene Human mut-S Homologue 2), hMSH6 (Gene Human mut-S Homologue 6)¹⁹. O gene hMLH1 está localizado no cromossoma 3p21-23^{14,15} e o hMSH2 no cromossoma 2p21, em área inicialmente identificada como região importante para genes envolvidos no HNPCC^{22,24}. A observação de grande número de alterações nas sequências de microssatélites em determinado tecido tumoral demonstra ausência de função normal de reparo do DNA. Representa, conseqüentemente, evidência indireta que essa deficiência na ação das proteínas de reparo é causada pela presença de mutações nos genes anteriormente mencionados. Este defeito denomina-se erro de replicação (replications errors – RER +)^{11,30}. Os MSI representam uma característica fenotípica marcante da HNPCC estando presente em 80-90% dos tumores, e nos casos esporádicos chega a 15%^{2,4}.

Embora os genes estejam suscetíveis a um número de alterações químicas (mutações) ao acaso, a grande maioria delas é eliminada pelo sistema de reparo do DNA. Há variedade de mecanismos de reparo, cada uma catalisada por um conjunto diferente de enzimas. Quase todos mecanismos dependem da existência de duas cópias da informação genética, uma em cada fita da dupla hélice do DNA. Se a sequência em uma fita é danificada acidentalmente, a informação não é perdida, porque uma versão “backup” da fita alterada permanece

na sequência complementar de nucleotídeos na outra fita¹⁸. Além da falha no sistema de reparo, é necessária a ocorrência de mais de uma mutação para transformar célula normal em tumoral. As mutações devem ocorrer pelo menos cinco ou seis vezes de forma independente em uma única célula para que se estabeleçam todas as condições necessárias ao desenvolvimento do câncer. Tais mutações podem ser dominantes ou recessivas. As mutações dominantes levam a um ganho de função, podendo causar o desenvolvimento de oncogenes que são formas mutadas de proto-oncogenes. Estes atuam na promoção do crescimento e divisão de células normais. Porém, na forma mutada, eles promovem o desenvolvimento do câncer. Já as mutações recessivas levam à perda de função e podem alterar ou inativar genes supressores de tumor (GST). Seus produtos são necessários para inibir o crescimento celular, o ciclo de divisão e prevenir o desenvolvimento do câncer. Essas mutações, no entanto, não destroem as células mutadas e fornecem vantagem competitiva sobre as células vizinhas normais^{3,16}. Os genes de reparo atuam assegurando que cada informação genética seja corretamente copiada durante a replicação do DNA. Mutações nesses genes levam ao aumento na frequência de outras mutações⁸.

Sob o ponto de vista genético o câncer colorretal (CCR) pode ser dividido em dois grupos: os esporádicos, que ocorrem sem caráter familiar e correspondem cerca de 85% dos casos e os hereditários, que ocorrem devido a defeito genético herdado na família, geração após geração. Nos casos hereditários, o CCR ocorre em idades mais precoces - a partir dos 20 anos - e possuem como característica clínica a presença de várias pessoas dentro de uma mesma família acometida de câncer intestinal^{6,9}. O resultado do tratamento do CCR está diretamente relacionado ao diagnóstico precoce, ou seja, quanto mais cedo se realizar o diagnóstico, maior o índice de cura, chegando-se a mais de 90% nos casos iniciais. Nos últimos anos, com o rápido e crescente desenvolvimento das técnicas moleculares, identificaram-se defeitos genéticos específicos de pelo menos duas das principais síndromes hereditárias do intestino grosso, a polipose adenomatosa familiar (PAF) e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). Ambos são transmitidos verticalmente, de uma geração para outra, através de padrão de herança Mendeliano, em geral do tipo autossômico dominante²⁸. O proto-oncogene (K-ras), os genes supressores tumorais (APC, DCC e TP53) e os genes reparadores do DNA ou MMR (do inglês, mismatch repair – genes denominados MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 e MSH6) têm participação central no desenvolvimento do CCR. Aproximadamente 25% a 40% da molécula de DNA é formada por sequências repetitivas de nucleotídeos, as quais podem ser observadas diversas vezes em todo o genoma e subdivididas em repetições dispersas e repetições tandem (ou satélite)¹⁰. Estas repetições podem ser classificadas de acordo com a extensão da sequência

repetitiva em: satélite, minissatélite e microssatélite, dependendo do número de nucleotídeos. O número de repetições de minissatélite e microssatélite varia entre os indivíduos, motivo pelo qual eles são considerados impressões digitais do DNA e utilizados em exames de paternidade⁴. A instabilidade de microssatélite – MSI constitui-se na observação de que o DNA extraído de células de determinados tumores apresentam alterações no número de unidades repetitivas em um ou mais microssatélites quando comparados aos mesmos microssatélites existentes em amostras de DNA de tecido normal do mesmo indivíduo - células sanguíneas, por exemplo. Portanto, as células tumorais apresentam “impressões digitais” defeituosas em seu DNA quando comparadas aos outros tecidos do organismo.

A hipermetilação do promotor do gene hMLH1 parece ser uma das principais alteração genéticas presente no CCR. A análise molecular da via carcinogênica mutadora através da pesquisa de MSI tem aplicação prática na clínica, uma vez que tumores ditos “mutadores” exibem características biológicas distintas^{3,29}. Há evidências de que esses tumores se distinguem por diversos aspectos: localização (proximal no colon), idade (menos avançada), aspecto histológico (maior incidência de tumores mucinosos) e prognóstico (melhor sobrevida em relação ao CCR estável para microssatélites)²⁶. Entretanto, os tumores com MSI estão associados com resistência à quimioterapia com 5-fluorouracil (5FU) e à menor sobrevida dos pacientes, pós-tratamento com a droga (5FU)^{5,6,15,20}. MSI em CCR pode ainda ser marcador de suscetibilidade herdada ou adquirida para outros tumores, tais como câncer gástrico, de útero e ovário²¹. Diversas teorias têm sido propostas para explicar porque tumores MSI-H (Alta-instabilidade) apresentam melhor prognóstico em carcinomas colorretais esporádicos, apesar das características desfavoráveis.

Este estudo tem por objetivo avaliar o perfil molecular dos tumores submetidos à microcirurgia endoscópica transanal (TEM) para tratamento do câncer de reto.

MÉTODOS

Foram selecionados 38 espécimes cirúrgicos produtos da ressecção pela microcirurgia endoscópica transanal (TEM) no período de 2003 a 2006, avaliadas segundo o estadiamento patológico²⁷. Após, foram escolhidas amostras da região tumoral dos espécimes emblocados em parafina, sendo realizada a dissecação e extração do DNA utilizando-se kit comercial (QIAmp® DNA FFPE Tissue Handbook – Qiagen, Califórnia, USA). Os tumores colorretais foram testados para instabilidade de microssatélite – MSI utilizando um painel de cinco pares de primers (BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S2720) (Tabela 1). O método utilizado para

detecção dos marcadores de microssatélite foi VNTRs (Variable Number of Tandem Repeats) Kashyap et al., 2004. Foi utilizado 100 ng/ul de DNA purificado em volume final de 25µl na reação de PCR. As condições da PCR foram: desnaturação inicial na temperatura de 95°C por período de cinco minutos, seguida por 10 ciclos contínuos de desnaturação a 95°C por um minuto de anelamento iniciando à 60°C e baixando 1°C a cada ciclo até atingir a temperatura de 51°C no último ciclo com extensão a 72°C por um minuto e a 72°C por mais um minuto. Terminando os 30 ciclos, o material permaneceu cinco minutos na temperatura de 72°C para fornecer maior tempo de extensão com totalidade de 40 ciclos. Subsequentemente, os produtos da PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamina a 10% (16 horas, 450 V, temperatura ambiente) corado com nitrato de prata a 0,1%.

Análise estatística

Para as análises de associação foram realizados os testes de independência entre as variáveis utilizando-se os testes qui-quadrado com correção de Yate's ou de Fisher. Foi calculado o odds ratio, com intervalo de confiança de 95%. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

RESULTADOS

Dos 38 casos de câncer de reto operados pela TEM (Figura 1), 63% eram homens e 47% mulheres com média de idade de 58,4 anos. Em relação ao tipo tumoral 58% eram adenomas - 24% de baixo e 76% de alto grau - e 42% carcinomas (Tabela 1). Quanto à profundidade da ressecção verificou-se que em 80% incluía a gordura perirretal e em 20% até a muscular própria.

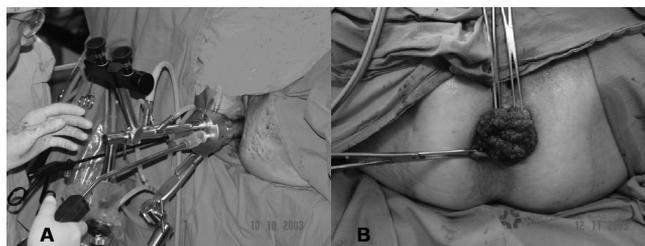


FIGURA 1 – Microcirurgia endoscópica transanal (TEM): A) aparelho com o sistema endoscópico posicionado; B) adenoma retal baixo protuberante (prolapsado)

TABELA 1 - Painel com os cinco marcadores de microssatélites

Microssatélite	Localização	Tamanho	Primer forward	Primer reverse
BAT25	gene c-Kit cr. 4q12	110 - 130 pb	5' - TCG CCT CCA AGA ATG TAA GT - 3'	5' - TCT GCA TTT TAA CTA TGG CTC - 3'
BAT26	gene hMSH2 cr. 2p	100 - 120 pb	5' - TGA CTA CTT TTG ACT TCA GCC - 3'	5' - AAC CAT TCA ACA TTT TTA ACC C - 3'
D2S123	gene hMSH2 cr. 2p	200 - 230 pb	5' - AAA CAG GAT GCC TGCC TT TA - 3'	5' - GGA CTT TCC ACC TAT GGG AC - 3'
D5S346	gene APC cr. 5q21q22	100 - 130 pb	5' - AGC AGA TAA GAC AGT ATT ACT AGT T - 3'	5' - ACT CAC TCT AGT GAT AAA TCG GG - 3'
D17S25Q(MH15CA)	gene BRCA1 cr.17q11.2-q12	140 - 170 pb	5' - GGA AGA ATC AAA TAG ACA AT - 3'	5' - GCT GGC CAT ATA TAT ATT TAA ACC - 3'

O microsatélite com maior frequência de amplificação foi o BAT26 (100%) e o menor o D17S2720 (85,4%). Dezesesseis casos (42%) apresentaram MSI. Destes, dez eram carcinomas, dois adenomas de baixo grau e quatro de alto. Vinte e dois (68%) casos apresentaram microsatélite estáveis (MSS). A perda alélica dos marcadores de microsatélites foi estatisticamente significativa nos casos de carcinoma em relação aos adenomas ($p = 0,0003$; OR 16,7; IC95%: 2,8-98,0) (Tabela 2 e Figura 2).

TABELA 2 - Perda alélica dos marcadores de microsatélites em pacientes com carcinoma e adenoma retais

	Pacientes com perda alélica (N=16)	Pacientes sem perda alélica (N=22)	P	OR
Carcinoma	10	2	0,0003	16,7 IC95% 2,8-97,9
Adenoma	6	10		

Teste exato de Fisher

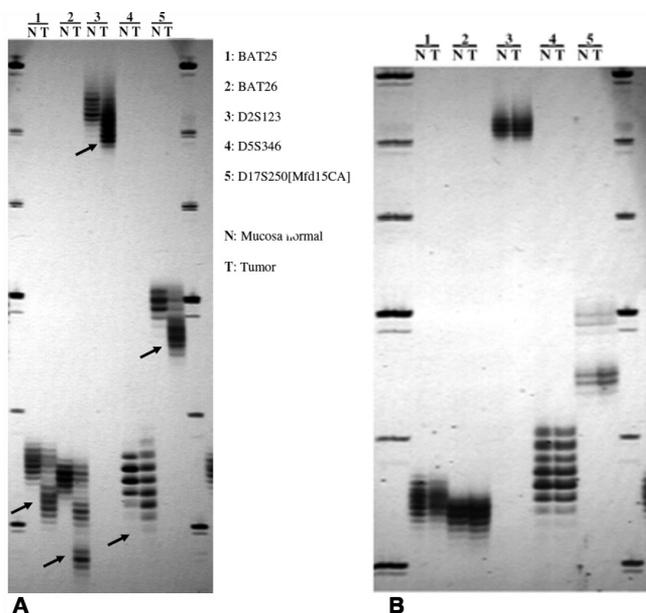


FIGURA 2 – A) Instabilidade de microsatélite – MSI-H. A seta indica os alelos extras que surgem a partir dos erros de replicação do DNA na amostra de tumor quando comparados com amostra de DNA normal; B) estabilidade de microsatélite (MSS) em um caso de carcinoma colorretal e eletroforese em gel de poliacrilamida com uréia a 6% corado com nitrato de prata

deu suporte à hipótese de que tumores com MSI-H estão associados com a produção de novos epítomos imunogênicos devido ao sistema de reparo defeituoso. Essa hipótese tenta explicar porque pacientes com CCR esporádico MSI-H apresentam resposta imunológica antitumor mais efetiva do que pacientes com MSS com desfecho clínico mais favorável. Neste estudo observou-se que a presença de MSI-H foi significativamente mais elevada em carcinomas do que em adenomas, corroborando com o valor prognóstico dos marcadores MSI no CCR. Deve-se ainda destacar que os artigos publicados sobre MSI em CCR são principalmente em populações europeias e orientais, sendo poucos estudos realizados na população brasileira. Considerando-se que nosso país apresenta grande heterogeneidade genética - resultado de cinco séculos de miscigenação -, faz-se necessário estudos que estabeleçam a frequência de MSI nas diferentes regiões do Brasil.

A sobrevida dos pacientes com CCR metastático (mCRC) melhorou progressivamente ao longo das últimas décadas. Foi devida principalmente à novas combinações quimioterápicas (5-fluorouracil, irinotecano, oxaliplatina), como à introdução de novas terapias. Entre elas destacam-se dois anticorpos monoclonais contra o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) – o cetuximab e panitumumab - que demonstraram eficácia no tratamento do mCRC. No entanto, devido à toxicidade e aumento de custos, é indispensável a utilização de ferramentas capazes de selecionar os pacientes que têm maior probabilidade de se beneficiar.

Portanto, a identificação de casos de câncer retal com MSI pode permitir a intervenção quimioterápica neoadjuvante e específica para cada paciente poupando-o assim de toxicidade terapêutica e possibilitando a aplicação de uma nova modalidade terapêutica.

CONCLUSÕES

A instabilidade de microsatélite (MSI-H) foi significativamente associada com carcinomas retais, confirmando sua utilização como marcador prognóstico na carcinogênese retal.

DISCUSSÃO

A identificação de parâmetros que refletem o comportamento biológico do câncer de reto é determinante no prognóstico e no incremento da terapia oncológica. Os resultados deste estudo evidenciaram a importância da análise molecular no aparecimento de tumores iniciais de reto, podendo implicar no delineamento terapêutico.

A presença de MSI pode ser significativamente corroborada pela avaliação concomitante do número de linfócitos citotóxicos ativos intramurais²⁷. Essa observação

REFERÊNCIAS

1. Abe Y, Masuda H, Okubo R. Microsatellite instability of each tumor in sporadic synchronous multiple colorectal cancers. *Oncol Rep.* 2001 Mar-Apr;8(2):299-304..
2. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer.* 2008;7(1):41-52.
3. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5248-57..

4. Carethers JM, Smith EJ, Behling CA, Nguyen L, Tajima A, Doctolero RT, Cabrera BL, Goel A, Arnold CA, Miyai K, Boland CR. Use of 5-fluorouracil and survival in patients with microsatellite-unstable colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2004 Feb;126(2):394-401.
5. Chang EY, Dorsey PB, Johnson N, Lee R, Walts D, Johnson W, Anadiotis G, Kiser K, Frankhouse J. A prospective analysis of microsatellite instability as a molecular marker in colorectal cancer. *Am J Surg*. 2006 May;191(5):646-51..
6. Church JM. Prophylactic colectomy in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Med*. 1996 Dec;28(6):479-82.
7. Cooper GM. A célula: uma abordagem molecular. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
8. Cotrim MAA. A terapia genética do câncer, 2003. Disponível em: <http://www.ufv.br/dbg/BIO240/ac03htm>. Acesso em: 15/07/2007.
9. Coura RS, Prolla PA, Prolla JC. Hereditary non-polipomatous colorectal cancer: hereditary predisposition, diagnosis and prevention. *Arq Gastroenterol* 2004;42(2):99-105.
10. Cutait R, Cotti G, Garicochea B, Muraro C, Carvalho F, Leite K et al. Instabilidade de microssatélites em portadores de câncer colorretal. *Rev Bras Coloprocto* 2002; 4: 225-32.
11. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*. 1997 Nov 1;57(21):4749-56.
12. Gervaz P, Cerottini JP, Bouzourene H, Hahnloser D, Doan CL, Benhattar J, Chaubert P, Secic M, Gillet M, Carethers JM. Comparison of microsatellite instability and chromosomal instability in predicting survival of patients with T3N0 colorectal cancer. *Surgery*. 2002 Feb;131(2):190-7.
13. Grizzle WE, Shibata D, Manne U, Myers RB, Frost AR, Srivastava S, Henson DE, Gazdar A (eds.). *Molecular Pathology of Early Cancer* 1999, 135-170.
14. Jeon CH, Lee HI, Shin IH, Park JW. Genetic alterations of APC, K-ras, p53, MSI, and MAGE in Korean colorectal cancer patients. *Int J Colorectal Dis*. 2008 Jan;23(1):29-35.
15. Kashyap VK, Sitalaximi T, Chattopadhyay P, Trivedi R. Dna profiling technologies in forensis analysis. *Int J Hum Genet*. 2004;4(1):11-30.
16. Kreuzer H. *Engenharia genética e biocologia*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.
17. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, X.-Y. Guan, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Järvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1215-25.
18. Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet*. 1993 Nov;5(3):279-82..
19. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003 Mar 6;348(10):919-32.
20. Moraes R, Losso G, Matias JEF, Mailanendes L, Telles JEQ, Malafaia O, Coelho JCU. Microcirurgia Endoscópica Transanal e Tratamento Adjuvante no Câncer Retal Precose. *ABCD Arq Bras Cir Dig*. 2011;24(1): 113-120.
21. Nilbert M, Planck M, Fernebro E, Borg A, Johnson A. Microsatellite instability is rare in rectal carcinomas and signifies hereditary cancer. *Eur J Cancer*. 1999 Jun;35(6):942-5.
22. Nyström-Lahti M, Sistonen P, Mecklin JP, Pylkkänen L, Aaltonen LA, Järvinen H, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomäki P. Close linkage to chromosome 3p and conservation of ancestral founding haplotype in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21;91(13):6054-8.
23. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen S, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, Petersen GM, Hamilton SR, Chapelle A, Vogelstein B. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 1993 May 7;260(5109):810-2.
24. Pinho MSL. Biologia molecular no câncer colorretal:um corte atual na literatura. *Rev bras Coloproct* 2002; 22(4):284-288LEWIN, BENJAMIN. *Gene VII*. Porto Alegre: Artmed, 2001.
25. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, Tu D, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003 Jul 17;349(3):247-57..
26. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, Slattery ML. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at the population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Sep;10(9):917-23.
27. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993 May 7;260(5109):816-9.
28. 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 Sep 1;319(9):525-32..
29. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, O'Connor T, Norrie M, Wu R, Hawkins N. Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001 Jun;48(6):821-9.