

Letícia dos Santos Yamane

**CARACTERIZAÇÃO MUTACIONAL DOS ONCOGENES *KRAS* E *BRAF* E ANÁLISE DE MSI NAS
LESÕES PRECURSORAS E DO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Peixoto Guimarães

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos,SP
2013

Letícia dos Santos Yamane

**CARACTERIZAÇÃO MUTACIONAL DOS ONCOGENES *KRAS* E *BRAF* E ANÁLISE DE MSI NAS
LESÕES PRECURSORAS DO CÂNCER COLORRETAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Peixoto Guimarães

Co-orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Reis

Barretos,SP
2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da Fundação Pio XII –
Hospital de Câncer de Barretos

Y19c Yamane, Leticia dos Santos.

**Caracterização molecular dos oncogenes KRAS e BRAF e
análise de MSI nas lesões precursoras do câncer colorretal.**

/ Leticia dos Santos Yamane – Barretos, 2013.

81 f. ; 30 cm ; il.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Fundação
Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2013.

Orientador: Dra. Denise Peixoto Guimarães.

Co-orientador: Dr. Rui Manuel Reis

1. Adenomas. 2. Pólipos serrilhados. 3. *KRAS*. 4. *BRAF*. 5.
Instabilidade de microsátélites. I. Autor. II. Guimarães, Denise
Peixoto. III. Reis, Rui Manuel. IV. Título.

CDD 614.4

FOLHA DE APROVAÇÃO

Letícia dos Santos Yamane

Caracterização mutacional dos oncogenes KRAS e BRAF e análise de MSI nas lesões precursoras do câncer colorretal

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 25/03/2013

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

Instituição: Fundação Antônio Prudente – Hospital do Câncer A. C. Camargo

Prof. Dr. Claudio Lyoiti Hashimoto

Instituição: Hospital das Clínicas – FMUSP

Prof. Dr. José Humberto T. G. Fregnani

Instituição: Fundação Pio XII - Hospital de Cancer de Barretos

Prof.^a Dra. Denise Peixoto Guimarães

Orientador

Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

Presidente da Banca Examinadora

DECLARAÇÃO DE RESPONSABILIDADE DOS PESQUISADORES

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos – Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós-Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentação de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos.

Embora o Núcleo de Apoio ao Pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos tenha realizado as análises estatísticas e orientado sua interpretação, a descrição da metodologia estatística, a apresentação dos resultados e suas conclusões são de inteira responsabilidade dos pesquisadores envolvidos.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãos e à minha avó

AGRADECIMENTOS

Após um período de crescimento e aprendizado, chego ao fim de mais uma fase muito importante em minha vida. Portanto, gostaria de agradecer a Deus por ter me guiado desde sempre, pela fé e esperança que se fizeram presentes em todos os momentos e por ter me permitido concretizar este sonho. Contudo, o desenvolvimento deste trabalho não seria possível sem a colaboração de várias pessoas, por isto gostaria de expressar meu carinho a todos que me ajudaram nesta caminhada.

Em primeiro lugar gostaria de agradecer à minha orientadora, a Professora Dra. Denise Peixoto Guimarães, que fez com que eu descobrisse o quanto que é maravilhoso o universo da pesquisa, além de ser responsável pela conclusão desta fase. Agradeço por ter acreditado em mim e por todos os ensinamentos compartilhados desde a nossa primeira reunião. Aprendi muito com você, e sou imensamente grata pelas conversas, pela paciência, por ser presente e acessível, por toda a preocupação que sempre teve comigo e por ter me proporcionado meios de desenvolver da melhor maneira este trabalho. A minha evolução neste período deve-se ao seu profissionalismo e orientações.

Quero expressar também os meus mais sinceros agradecimentos ao meu co-orientador, o professor Dr. Rui Manuel Reis. Obrigada por ter acreditado no meu potencial e por ter me apresentado a fascinante Biologia Molecular. Sou grata pelos ensinamentos diários, por me fazer enxergar a importância de cada detalhe, pela confiança, pelas orientações e por ter participado tanto quanto a Dra. Denise do meu crescimento profissional. Agradeço pela oportunidade de trabalhar com vocês.

Gostaria de agradecer também ao Professor Dr. Cristovam Scapulatempo Neto por ter dedicado o seu tempo e possibilitado através do seu conhecimento, o desenvolvimento deste projeto. Obrigada pelos ensinamentos, por ter participado desta jornada e pela paciência.

Não tenho como agradecer ao estatístico, mas acima de tudo, ao amigo Cleyton Zanardo por tantas madrugadas que se disponibilizou a fazer as análises comigo. Sem a sua dedicação a conclusão deste trabalho não seria possível, portanto, muito obrigada pelas inúmeras horas que passamos juntos para compreender os resultados deste estudo.

Ao Dr. Fauze Maluf e ao Dr. José Humberto Fregnani, obrigada por terem direcionado o projeto durante as bancas de acompanhamento e Qualificação.

Quero ainda agradecer ao Hospital de Câncer de Barretos e a todos aqueles que colaboraram para que este sonho tornasse possível. Ao Dr. Lorenzi, meus mais profundos agradecimentos por ter acreditado que eu seria capaz e pelo incentivo. Aos amigos Camila Correia, Daniela Massaneiro e Douglas Vieira, obrigada pelos conselhos e palavra de conforto. Sou imensamente grata aos colegas de trabalho Gustavo e Mariângela por terem dividido comigo as responsabilidades e por terem me auxiliado desde o primeiro dia. Agradeço ainda ao Gustavo Berardinelli, Allini Mafra, Fabiana, e todos os integrantes do Núcleo de Apoio ao Pesquisador, Programa de Auxílio e Incentivo ao Pesquisador, Departamento de Patologia e SAME. Gostaria de agradecer em especial a todos os colaboradores do Departamento de Endoscopia pela dedicação e paciência, que possibilitou o desenvolvimento e conclusão deste estudo.

Quero expressar a minha gratidão também às colaboradoras da Biblioteca, à Brenda e à Silvana pela prontidão em nos auxiliar e pelo profissionalismo. Aos amigos de pós-graduação, em especial Croider e Maíra, por compartilharem o mesmo objetivo e por estarem sempre presentes durante o desenvolvimento e conclusão desta jornada.

O Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular (CPOM) me proporcionou desenvolver grande parte da metodologia deste trabalho, logo, agradeço pela oportunidade de trabalhar neste laboratório maravilhoso. Contudo, todas as horas que eu passei no CPOM não seriam tão agradáveis sem a companhia de pessoas por quem tenho grande carinho e admiração. Abel, Adriana Lorenzi, Ana Laura, Augusto, Carol Laus, Edenir, Flávia, Lídia, Marcela, Márcio, Mathias, Natalia Campacci e Viviane muito obrigada por terem compartilhado tantos momentos agradáveis e por me ajudarem sempre que necessário. À Taciane, minha companheira de apartamento, obrigada por alegrar os meus dias. Ao irmão Maicon, obrigada pelo incentivo e companhia principalmente na fase final da minha dissertação. Portanto, agradeço em especial à Adriana Cruvinel, a Olga Martinho e ao Renato José, pois aprendi muito com vocês e sou grata pela atenção que destinaram a mim, e principalmente pela amizade. Obrigada pelos momentos compartilhados durante os dias, noites e finais de semana que passamos juntos neste laboratório, sem vocês esta jornada teria sido muito mais difícil. A todos aqueles que pertencem a este departamento, muito obrigada por terem se tornado uma verdadeira família.

Finalmente, gostaria de agradecer aos meus pais, Cesar e Maria Helena, por quem tenho grande admiração, pelo apoio incondicional durante esse período. Obrigada por compreenderem a minha ausência e pelo incentivo, principalmente nos momentos mais difíceis. Aos meus irmãos, Lauriane e Bruno, obrigada por compartilharem noites em claro me fazendo companhia, por ouvir meus desabafos e por estarem sempre comigo mesmo que distante. Sou grata também aos familiares e amigos, principalmente à Maiara, pela confiança e boas vibrações. Gostaria ainda de expressar o meu imenso amor e carinho pela minha avó Maria, que foi a grande inspiração do meu trabalho. Eu amo vocês!

Enfim, sou grata a todos que acreditaram em mim e é com imensa alegria que compartilho a minha dissertação com vocês.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1.	Epidemiologia do câncer colorretal	1
1.2.	História natural do câncer colorretal: lesões precursoras	2
1.2.1.	Adenomas	3
1.2.2.	Pólipos serrilhados	4
1.3.	Vias genéticas da carcinogênese colorretal	9
1.3.1.	Via da instabilidade cromossômica: adenoma-carcinoma	9
1.3.2.	Via do serrilhado	12
1.3.3.	Outras vias moleculares	15
1.4.	Da clínica ao estadiamento do câncer colorretal	16
1.5.	Tratamento	18
1.6.	Prevenção do câncer colorretal	19
1.6.1.	Estratificação de risco	20
1.6.2.	Deteção das lesões precursoras	20
2.	JUSTIFICATIVAS	22
3.	OBJETIVOS	23
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	24
4.1.	Pacientes	24
4.2.	Método endoscópico e lesões	24
4.3.	Extração de DNA	25
4.4.	Análise mutacional de <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>	25
4.5.	Análise de MSI	26
4.6.	Análises estatísticas	27

5.	RESULTADOS	28
5.1.	Características clínico-patológicas dos pacientes com lesões precursoras do câncer colorretal	28
5.2.	Alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal	31
5.3.	Associação entre as lesões precursoras do câncer colorretal e adenocarcinomas colorretais	38
6.	DISCUSSÃO	43
6.1.	Características endoscópicas e histopatológicas das lesões precursoras do câncer colorretal	43
6.2.	Alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal	45
6.3.	Relação entre lesões precursoras do câncer colorretal e os adenocarcinomas colorretais	48
6.4.	Direções futuras	49
7.	CONCLUSÃO	51
8.	REFERÊNCIAS	52

ANEXOS

ANEXO 1 – Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Ficha de coleta de dados

ANEXO 3 – Artigo de revisão submetido para World Journal of Gastroenterology

RESUMO

Yamane L.S. Estudo mutacional dos oncogenes *KRAS* e *BRAF* e análise de MSI nas lesões precursoras e do câncer colorretal . **Dissertação (Mestrado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2013.

Introdução: O câncer colorretal (CCR) representa um dos tipos de câncer mais incidentes em todo o mundo, incluindo o Brasil, onde é o terceiro com maior incidência e o quinto mais letal. Para a redução da incidência e mortalidade, é necessário detectar e ressecar as suas lesões precursoras. O adenoma é a principal lesão precursora e recentemente, os pólipos serrilhados foram descritos como um grupo de lesões colorretais com potencial de malignidade, mas os dados relacionados à sua caracterização morfológica e biológica ainda são escassos e ainda não relatado na população Brasileira. **Objetivos:** Determinar a frequência de mutações dos oncogenes *KRAS* e *BRAF* nas lesões precursoras do CCR; Avaliar a presença de instabilidade de microssatélite (MSI) nas lesões precursoras do CCR; Avaliar a associação entre as alterações moleculares, anatomo-patológicas, e morfológicas nas lesões colorretais; e comparar com as alterações encontradas no CCR. **Materiais e métodos:** Uma série de 342 lesões foram endoscopicamente ressecadas de 155 pacientes referidos para realização de colonoscopia no Hospital de Câncer de Barretos. A localização dos pólipos, tamanho e classificação histológica foram registrados. Após a caracterização morfológica de todas as lesões, foram selecionadas 103 lesões (uma de cada paciente) incluindo 50 adenomas e 53 pólipos serrilhados que foram submetidos às análises de mutação *KRAS* (códon 12 e 13), mutação *BRAF* V600E e *status* de MSI. **Resultados:** Histologicamente, os adenomas foram as lesões mais frequentes (70,2%), sendo a maioria tubular (94,2%), com displasia de alto grau detectada em 5,4% e classificadas como adenomas avançados em 18,3%. Dentre os pólipos serrilhados, 82,4% eram hiperplásicos, 12,7% adenomas serrilhados sésseis, 2,0% adenomas serrilhados tradicionais e 2,9% pólipos mistos. Mutação em *KRAS* foi detectada em 13,6% das lesões precursoras e 46,8% dos adenocarcinomas colorretais. Mutação em *KRAS* foi observada nos adenomas (14%) e nos pólipos hiperplásicos (18,4%) e em nenhum adenoma serrilhado. Mutação em *BRAF* foi encontrada em 9 (8,7%) lesões precursoras e 3 (6,5%) CCRs. Mutação *BRAF* foi encontrada em 17% dos pólipos serrilhados e em nenhum adenoma ($p < 0,001$). Todos os tipos de mutações

encontradas nas lesões precursoras foram também detectadas no CCR. Lesões com mutações *KRAS* foram predominantemente localizadas no cólon esquerdo ($p=0,05$). Não houve associação entre mutação em *BRAF* e as características endoscópicas. MSI-H não foi observado em nenhuma lesão precursora, e foi detectado em 10,6% dos adenocarcinomas colorretais. **Conclusões:** As frequências de mutação nos oncogenes *KRAS* e *BRAF* e o status de MSI são similares às descritas na literatura internacional, tanto no grupo de lesões precursoras quanto entre os adenocarcinomas colorretais. Este trabalho poderá contribuir para a melhor compreensão da carcinogênese colorretal na população Brasileira e permitir o desenho mais adequado de estratégias do rastreamento e detecção precoce do câncer colorretal.

PALAVRAS-CHAVE: Adenomas; pólipos serrilhados, *KRAS*, *BRAF*, instabilidade de microsátélites

ABSTRACT

Yamane L.S. Mutational study of KRAS and BRAF oncofenes and analysis of MSI in precursor lesions and in colorectal cancer. **Dissertation (Master's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2013.

Background: Colorectal cancer (CCR) is one of the most frequent cancers worldwide. In Brazil, CCR is the third with higher incidence and the fifth cause of deaths by cancer. To decrease its incidence and mortality, it is fundamental to detect and remove their precursor lesions. Adenoma is the main precursor lesion and recently, the serrated polyps were described as a group of colorectal lesions with malignant potential, but reports concerning their morphologic and biologic characterization are still limited, and there are no studies in Brazilian population. **Aims:** Determine the frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations in CCR precursor lesions; evaluate the presence of microsatellite instability (MSI) in the CCR precursor lesions; evaluate the association between molecular, pathologic and morphologic alterations in precursor lesions; and compare with the alterations detected in CCR. **Materials and methods:** A serie of 342 lesions were endoscopically removed from 155 patients referred to colonoscopy at Barretos Cancer Hospital. The location, size and histologic classification of polyps were registred. After morphologic classification of all lesions, it was selected 103 lesions (one from each patient) including 50 adenomas and 53 serrated polyps, that were submitted to mutation analysis of *KRAS* (codons 12 and 13), *BRAF* (V600E) and MSI status. **Results:** Histologically, the adenomas were the main precursor lesions (70.2%), being the majority tubular (94.2%) and high grade dysplasia was detected in 5.4%, while advanced adenomas were classified in 18.3% of them. Among serrated polyps, 82.4% were hyperplastic, 12.7% sessile serrated adenomas, 2.0% traditional serrated adenomas and 2.9% mixed polyps. *KRAS* mutations were detected in 13.6% and 46.8% of precursor lesions and colorectal adenocarcinomas, respectively. *KRAS* mutations were observed in adenomas (14.0%) and in hyperplastic polyps (18.4%), but in none serrated adenoma. *BRAF* mutation was found in 9 (8.7%) precursor lesions and in 3 (6.5%) CCR. *BRAF* mutation was detected in 17% of serrated polyps and in none adenoma ($p < 0,001$). All mutations found in precursor lesions were observed in CCR. Lesions with *KRAS* mutations were predominantly located in

left colon ($p=0,05$). There were no association between *BRAF* mutations and endoscopic characteristics. MSI-H was not observed in precursor lesions, and was detected in 10.6% of colorectal adenocarcinomas. **Conclusions:** The frequency of *KRAS* and *BRAF* mutations and MSI status for both precursor and cancer lesions are similar to described in the international literature. The present work can contribute to a better understanding of CCR carcinogenesis in the Brazilian population, and allowed the designed of adequate strategies of screening and early detection of colorectal cancer.

KEYWORDS: Adenomas, serrated polyps, *KRAS*, *BRAF*, microsatellite instability

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Incidência e mortalidade por câncer no Brasil	1
Figura 2 -	Adenoma	3
Figura 3 -	Pólipo hiperplásico	7
Figura 4 -	Adenoma serrilhado séssil	7
Figura 5 -	Adenoma serrilhado tradicional (TSA)	8
Figura 6 -	APC/ β -catenina	10
Figura 7 -	Via das <i>mitogen-activated protein kinases</i> (MAPK)	11
Figura 8 -	Evolução da sequência adenoma-adenocarcinoma: CIN- instabilidade cromossômica	12
Figura 9 -	Esquema das sequências adenoma–carcinoma e pólipos serrilhados–carcinoma	13
Figura 10 -	Segmentos do cólon	16
Figura 11 -	Adenocarcinoma serrilhado	17
Figura 12 -	Adenocarcinoma bem diferenciado	18

- Figura 13** - Fotos obtidas a partir de Lâminas coradas por Hematoxilina/Eosina (HE) de casos representativos de lesões precursoras do câncer colorretal 30
- Figura 14** - Caso representativo de um adenoma serrilhado tradicional (TSA) com mutação *BRAF* 34

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Características histológicas, clínicas e frequência dos pólipos serrilhados	5
Tabela 2 -	Frequência de alterações moleculares nos pólipos serrilhados e adenocarcinomas serrilhados	14
Tabela 3 -	Grupamento do câncer colorretal por estádios	18
Tabela 4 -	Cálculo do tamanho amostral	27
Tabela 5 -	Indicações para realização de colonoscopia dos pacientes com lesões precursoras do câncer colorretal	28
Tabela 6 -	Características endoscópicas e histopatológicas das lesões precursoras do câncer colorretal	29
Tabela 7 -	Associação entre os tipos histológicos e características endoscópicas das lesões precursoras do câncer colorretal	31
Tabela 8 -	Tipos histológicos e frequência de mutações entre as lesões precursoras do câncer colorretal	32
Tabela 9 -	Características clínico-patológicas dos pacientes com mutação <i>KRAS/BRAF</i> entre as lesões precursoras	33
Tabela 10 -	Associação entre os tipos histológicos e as alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal	35
Tabela 11 -	Associação entre as alterações moleculares e as características	35

endoscópicas das lesões precursoras do câncer colorretal

Tabela 12 -	Associação entre as alterações em <i>KRAS</i> e as características endoscópicas no grupo dos adenomas	36
Tabela 13 -	Associação entre as alterações em <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> e as características endoscópicas no grupo dos pólipos hiperplásicos	37
Tabela 14 -	Associação entre as alterações em <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> e as características endoscópicas no grupo dos adenomas serrilhados	37
Tabela 15 -	Características clínico-patológicas dos adenocarcinomas colorretal	38
Tabela 16 -	Associação entre as alterações moleculares e as características morfológicas do câncer colorretal	40
Tabela 17 -	Características clínico e demográficas dos pacientes com adenocarcinomas colorretais com mutação <i>KRAS/BRAF</i>	41
Tabela 18 -	Associação entre as frequências de mutação <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i> nas lesões precursoras e nos cânceres colorretais de acordo com a localização	42

LISTA DE ABREVIATURAS

APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
CIMP	Fenótipo de metilação das ilhotas CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
FAP	Polipose adenomatosa familiar
GCHP	Pólipo hiperplásico rico em células calciformes
HNPCC	Câncer colorretal hereditário não polipose
HP	Pólipo hiperplásico
MAPK	Proteína quinase mitógeno-ativada
MMR	Sistema de reparo
MP	Pólipo misto
MPHP	Pólipo hiperplásico pobre em mucina
MSI	Instabilidade de microssatélites
MSI-L	Baixa instabilidade de microssatélites
MSI-H	Alta instabilidade de microssatélites
MSS	Estabilidade de microssatélites
MVHP	Pólipo hiperplásico microvesicular
SSA	Adenoma serrilhado séssil
OMS	Organização Mundial da Saúde
WHO	World Health Organization

1. INTRODUÇÃO

1.1. Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal representa um dos tipos de câncer mais incidentes em todo o mundo sendo o terceiro tipo de câncer mais incidente em homens e o segundo em mulheres¹. No Brasil, segundo as estimativas da incidência de câncer para 2012 do Ministério da Saúde, excetuando-se o câncer de pele não-melanoma, o câncer colorretal constitui o terceiro câncer mais frequente, com uma estimativa de cerca de 30.000 novos casos esperados em 2012, sendo mais prevalente no sexo feminino² (Figura 1). O câncer colorretal aparece como a segunda causa de morte por câncer nos EUA entre os homens de 40 a 79 anos e como quinta no Brasil, com uma estimativa em torno de aproximadamente 609.000 e 12.000 mortes por câncer colorretal em 2008, respectivamente^{1,3} (Figura 1).

(a) Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2012 por sexo, exceto pele não melanoma*

Localização primária	casos novos	percentual			Localização primária	casos novos	percentual
Próstata	60.180	30,8%	Homens	Mulheres	Mama Feminina	52.680	27,9%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.210	8,8%			Colo do Útero	17.540	9,3%
Cólon e Reto	14.180	7,3%			Cólon e Reto	15.960	8,4%
Estômago	12.670	6,5%			Glândula Tireoide	10.590	5,6%
Cavidade Oral	9.990	5,1%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.110	5,3%
Esôfago	7.770	4,0%			Estômago	7.420	3,9%
Bexiga	6.210	3,2%			Ovário	6.190	3,3%
Laringe	6.110	3,1%			Corpo do Útero	4.520	2,4%
Linfoma não Hodgkin	5.190	2,7%			Linfoma não Hodgkin	4.450	2,4%
Sistema Nervoso Central	4.820	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.450	2,4%

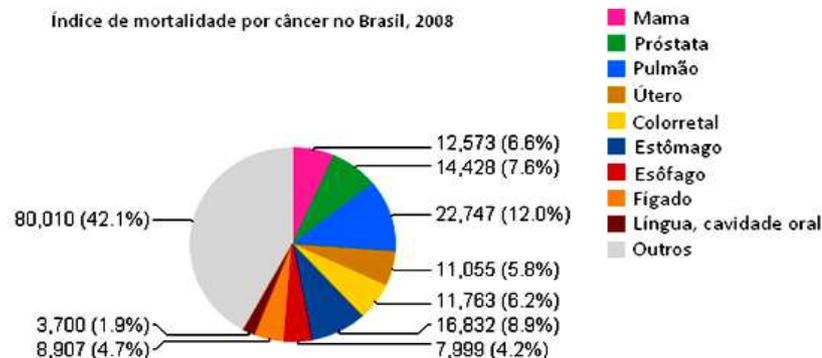
*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

INCA/Ministério da Saúde, 2012

(b) International Agency for Research on Cancer



Índice de mortalidade por câncer no Brasil, 2008



Globocan, 2008

Figura 1 - Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. (a) Estimativas de câncer no Brasil para o ano de 2012 com exceção do câncer de pele não melanoma; (b) Índice de mortalidade por câncer no Brasil^{2,3}

Aproximadamente 70 - 85% dos cânceres colorretais são esporádicos, onde a grande maioria dos casos ocorre em indivíduos com idade superior a 50 anos, sendo a idade média de diagnóstico de 66 anos⁴⁻⁷. Cerca 15 a 30% dos cânceres colorretais podem se desenvolver devido a fatores genéticos hereditários, incluindo a síndrome do câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC) e a polipose adenomatosa familiar (FAP)⁴. Estes cânceres acometem indivíduos mais jovens, normalmente antes dos 50 anos de idade, variando entre as síndromes. A HNPCC é causada por mutações germinativas em um dos genes do sistema de reparo *mismatch repair system* (MMR) (*MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* ou *GTBP/MSH6*), que são responsáveis por corrigir os erros que ocorrem durante a replicação e que afetam preferencialmente regiões de microssatélites^{8, 9}. Portanto, se ocorrer algum defeito nos genes do sistema de reparo, será observada a instabilidade das regiões de microssatélite ao longo de todo o genoma⁸. A FAP é causada por uma mutação germinativa no gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), que é um gene supressor tumoral altamente expresso nos tecidos normais do epitélio gastrointestinal^{4, 6}. A mutação germinativa do *APC* é encontrada em mais de 95% dos indivíduos com FAP, enquanto mutações no gene de excisão *MYH* são observadas no restante dos indivíduos acometidos por esta síndrome⁶. Além da idade e história pessoal e familiar de câncer colorretal, outros fatores de risco são importantes para o desenvolvimento deste tipo de neoplasias. Entre estes fatores incluem-se a história pessoal de pólipos, as doenças inflamatórias intestinais (retocolite ulcerativa e a doença de Crohn), assim como a dieta e o estilo de vida¹⁰. O consumo elevado de carne vermelha ou processada e de gorduras associada a uma redução do consumo de frutas e vegetais tem demonstrado associação com o desenvolvimento do câncer colorretal⁶. A obesidade aumenta o risco para desenvolver a doença, enquanto a prática de exercícios físicos promove uma redução do risco^{1, 6}. O consumo elevado de bebidas alcoólicas e o tabagismo são considerados fatores moderados de risco para o desenvolvimento da doença^{1, 11}.

1.2. História natural do câncer colorretal: lesões precursoras

A história natural do câncer colorretal segue uma sequência histopatológica conhecida, desde a mucosa normal passando pelas lesões precursoras e evoluindo ao câncer invasivo. Atualmente, os dois grupos histológicos que apresentam potencial maligno e são denominados lesões precursoras do câncer colorretal são os adenomas e os pólipos serrilhados.

1.2.1. Adenomas

Baseado no modelo da carcinogênese colorretal descrito por Fearon & Vogelstein em 1990¹² o adenoma representa o principal precursor do câncer colorretal e a sua incidência corre em paralelo a do câncer colorretal^{13, 14}. Os adenomas representam entre 51 a 67% das lesões precursoras do câncer colorretal¹⁵⁻¹⁸, sendo mais frequentes no sexo masculino. De acordo com estudos prévios, existe uma maior frequência de adenomas no cólon direito^{15, 18, 19}, embora haja relato de que os adenomas no cólon distal sejam também frequentes²⁰. Apesar de representar a principal lesão precursora do câncer colorretal, é importante ressaltar que apenas 5% dos adenomas evoluem para o câncer colorretal²¹.

Os adenomas são caracterizados histologicamente por núcleos alargados, hiper Cromáticos, com vários graus de estratificação e perda da polaridade⁶. Baseado na arquitetura, os adenomas podem ser classificados em tubulares, vilosos e túbulo-vilosos. A grande maioria dos adenomas tem arquitetura tubular (Figura 2).

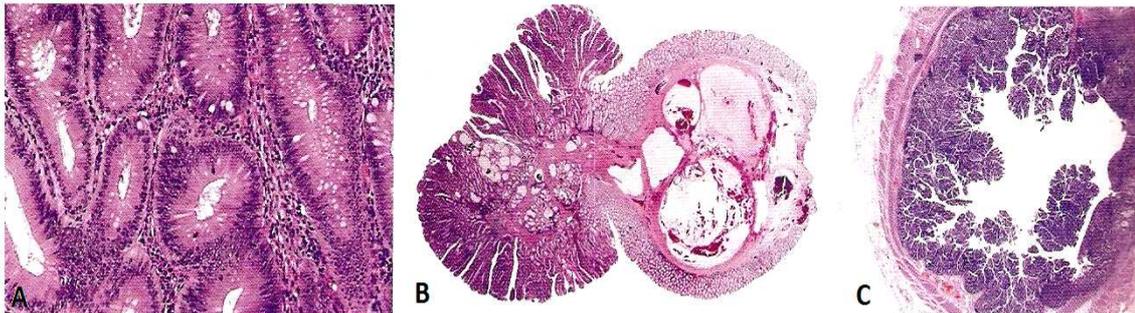


Figura 2 - Adenoma. (A) Adenoma tubular com baixo grau de displasia; (B) Adenoma tubulo-viloso; (C) Adenoma viloso⁶

A arquitetura vilosa é definida como projeções digitiformes do epitélio sobrepondo uma pequena quantidade de lâmina própria, enquanto os adenomas tubulo-vilosos são compostos por ambas as estruturas, tubular e vilosa⁶. Para serem classificados como tubulo-vilosos os adenomas devem ter de 25 a 75% de componente viloso.

Os adenomas são definidos pela presença de neoplasia intraepitelial (displasia), que podem ser classificadas em baixo ou alto grau, baseado no grau de complexidade da arquitetura, no grau de estratificação nuclear e na morfologia nuclear anormal. Os adenomas com displasia de alto grau podem ter focos de crescimento invasivo (Figura 2).

Com relação à morfologia, os adenomas, assim como as outras lesões precursoras do câncer colorretal podem ser polipóides ou não polipóides (plano-deprimido) ²². A maioria dos adenomas é menor do que 10mm e é polipoide ²².

Adenomas com pelo menos 10mm de diâmetro, com arquitetura vilosa ou com neoplasia intraepitelial de alto grau são chamados adenomas avançados e são aqueles que apresentam maior probabilidade de progressão para o câncer, assim como os adenomas não polipóides ^{6, 23}. Ou seja, apesar de todos os adenomas estarem susceptíveis a transformação maligna o risco de um câncer se desenvolver a partir de um adenoma aumenta com o tamanho, o grau da displasia e a vilosidade da lesão ²⁴.

1.2.2. Pólipos Serrilhados

Os pólipos serrilhados foram recentemente reconhecidos como apresentando um potencial maligno e incluídos como lesões precursoras do câncer colorretal. Os pólipos serrilhados formam um grupo heterogêneo de lesões colorretais que incluem: o pólipo hiperplásico (HP), adenoma serrilhado séssil (SSA), adenoma serrilhado tradicional (TSA) e a combinação de duas ou mais características (anteriormente classificado como pólipo misto (MP)) ²⁵. Na última classificação da Organização Mundial de Saude (OMS), a denominação de polipo misto foi abandonada devido a uma série de inconsistências na sua definição. Na tabela 1, estão descritas as principais características dos pólipos serrilhados.

Tabela 1 Características histológicas, clínicas e frequência dos pólipos serrilhados⁶

Pólipos serrilhados	Características histológicas	Serrilhamento	Localização predominante	Frequência entre lesões precursoras (%)	Frequência entre serrilhados (%)
HPS	-	-	Cólon esquerdo	10 – 15	80 – 90
MVHP	Células epiteliais com mucina microvesicular	Proeminente	Cólon direito	-	45 – 94,2
GCHP	Células maduras	Sutil	Cólon esquerdo	-	5,8 – 55
MPHP	Pobre em mucina	Proeminente	Cólon esquerdo	<1	<1
SSA	Dilatação da base das criptas (em forma de L ou T invertido)	Proeminente	Cólon direito	3 – 9	15 – 25
TSA	Padrão de crescimento viliforme, displasia citológica	Complexo	Cólon esquerdo	< 1	< 1
MP	Combinação de duas ou mais características (adenomas, HPs, SSA ou TSA)	-	-	1,5%	0,7 – 6,4

HPs- hiperplásicos, MVHP - microvesiculares, GCHP - ricos em células caliciformes, MPHP- pobres em mucina; SSA- adenoma serrilhado séssil, TSA adenoma serrilhado tradicional, MP pólipos misto

Histologicamente, os pólipos serrilhados são caracterizados pela morfologia serrilhada que é consequência da inibição da morte celular programada (apoptose) no

epitélio glandular ²⁶. A classificação histopatológica das lesões serrilhadas é baseada em critérios de arquitetura das criptas e características citológicas ⁶. Os pólipos hiperplásicos são os pólipos serrilhados mais comuns do cólon, correspondendo a aproximadamente 80 a 90% de todos os pólipos serrilhados e cerca de 10 a 15% dos pólipos do cólon. Pólipos hiperplásicos são geralmente pequenos (<5mm) e frequentemente localizados no cólon distal (75 a 80% no retossigmóide) ^{25, 27}. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), três tipos de pólipos hiperplásicos foram reconhecidos: os microvesiculares (MVHP), os ricos em células caliciformes (GCHP) e os pobres em mucina (MPHP). A diferença entre eles está na morfologia e na distribuição celular de mucina ^{6, 28, 29}. Todos os tipos de pólipos hiperplásicos são histopatologicamente caracterizados por criptas alongadas com diferentes graus de serrilhamento na metade superior das mesmas ^{6, 30} e ausência de displasia citológica. O microvesicular é o tipo mais frequente, e é caracterizado por células epiteliais microvesiculares, podendo ou não ser intercaladas com células caliciformes, e serrilhamento proeminente na porção basal das criptas ^{6, 28, 29, 31}. Por outro lado, nos pólipos hiperplásicos ricos em células caliciformes, predominam as células caliciformes com serrilhamento discreto ^{6, 29, 31, 32}. Os pólipos hiperplásicos microvesiculares são distribuídos entre o cólon direito e esquerdo, enquanto os pólipos hiperplásicos ricos em células caliciformes são mais frequentes no cólon esquerdo ⁶. Os pólipos hiperplásicos pobres em mucina são raros e por este motivo, discutidos com menor frequência. Entretanto, estes parecem ser mais frequentes no cólon esquerdo (6). Além do recente reconhecimento da importância destas lesões, e conseqüentemente limitado número de relatos, existem grandes divergências com relação à frequência de cada tipo de pólipo hiperplásico. Spring et al observaram que os pólipos microvesiculares corresponderam a 45% e os pólipos ricos em células caliciformes a 55% dos 120 pólipos hiperplásicos de uma série de 190 pacientes e 414 lesões estudadas ¹⁸. Recentemente, Kim et al descreveram que os pólipos microvesiculares, os pólipos ricos em células caliciformes e os pólipos pobres em mucina corresponderam a 66,7%, 24,4% e a 8,9%, respectivamente, entre os 45 pólipos hiperplásicos incluídos no estudo ²⁸. Por outro lado, Carr et al encontraram apenas 2 (5,6%) pólipos hiperplásicos ricos em células caliciformes entre os 34 pólipos hiperplásicos analisados ¹⁵. Além das divergências quanto à frequência dos diferentes tipos de pólipos hiperplásicos, ainda é indefinida a relevância clínica da distinção entre estas lesões ^{30, 33}.

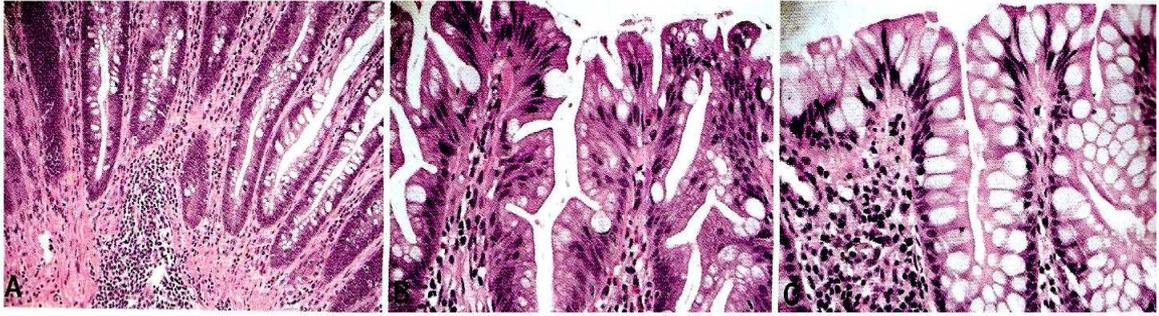


Figura 3 - Pólipo hiperplásico. (A) Pólipo hiperplásico microvesicular (MVHP), formado principalmente por células proliferativas, sendo observadas poucas células caliciformes. (B) Pólipo hiperplásico microvesicular. (C) Pólipo hiperplásico rico em células caliciformes (GCHP), formados exclusivamente por células caliciformes (células maduras) ⁶

Os adenomas serrilhados sésseis correspondem de 3 a 9% de todos os pólipos colorretais ^{15, 16, 18} e de 10 a 25% dentre os pólipos serrilhados ^{6, 18, 32}. Estão geralmente localizados no cólon direito. Dentre as suas características histopatológicas incluem o alongamento das criptas, o serrilhamento proeminente e, como característica principal, a dilatação da base das criptas que ao crescer paralelo à muscular da mucosa formam as criptas em forma de L ou T invertido (“forma de âncora”) ^{6, 29, 34, 35} (Figura 4).

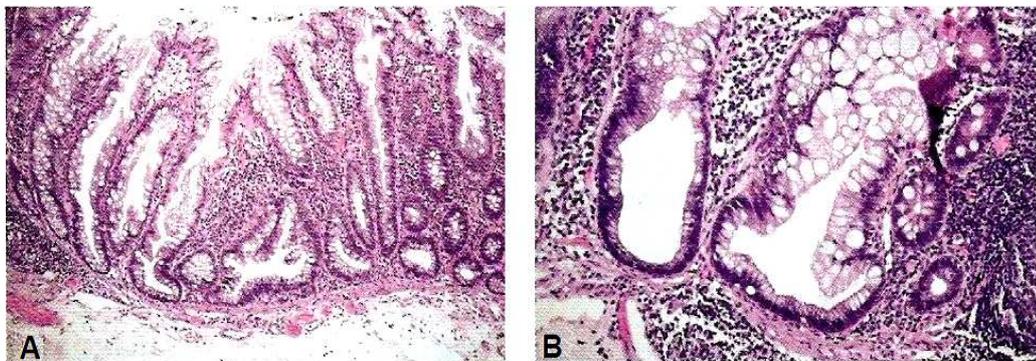


Figura 4 - Adenoma serrilhado sésseil. (A) Serrilhamento observado na base das criptas em baixa resolução. (B) Dilatação da base das criptas, comumente chamadas de L ou T invertido ⁶

Estas lesões podem ter atipia nuclear e mitoses, mas não apresentam displasia. A grande maioria dos adenomas serrilhados sésseis não evolui para o adenocarcinoma ³³. Vale ressaltar que os adenomas serrilhados sésseis apresentam semelhanças estruturais e podem ser confundidos com os pólipos hiperplásicos microvesiculares. A diferenciação diagnóstica é baseada na morfologia das criptas: se duas ou mais criptas adjacentes demonstrarem características de adenomas serrilhados sésseis, devem ser classificados como tal ⁶.

Os adenomas serrilhados tradicionais são lesões infrequentes, localizados frequentemente no cólon esquerdo e correspondem a menos de 1% das lesões serrilhadas (6, 28). Estas lesões são geralmente diagnosticadas quando displasia é observada em um pólipó serrilhado ³¹. Os adenomas serrilhados tradicionais têm um padrão de crescimento complexo e viliforme como um todo, demonstrando células com displasia citológica que podem indicar progressão para carcinoma. Os adenomas serrilhados tradicionais diferem dos sésseis principalmente porque os primeiros perdem a forma de âncora, levando à formação de criptas ectópicas ^{6, 15} (Figura 5).

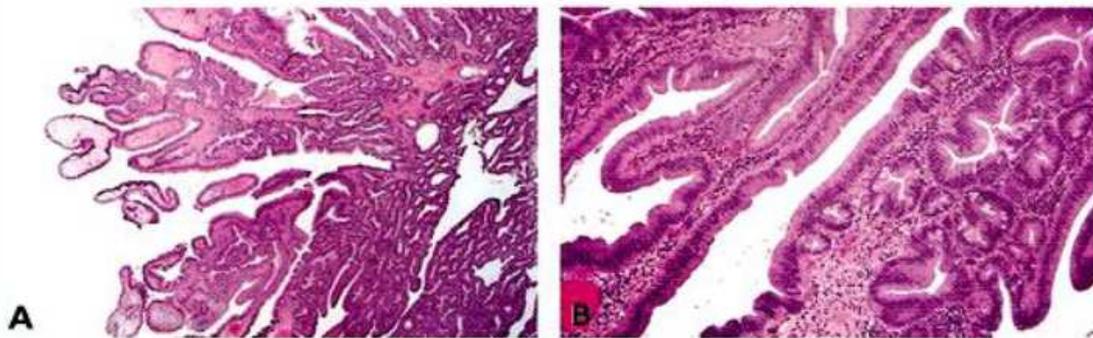


Figura 5 - Adenoma serrilhado tradicional (TSA). (A) Em baixa resolução, onde observa-se um serrilhamento complexo e viliforme. (B) Adenoma serrilhado tradicional com criptas ectópicas, que se projetam a partir da superfície ⁶

As mitoses são raras nos adenomas serrilhados tradicionais, e as células do epitélio glandular com citoplasma eosinofílico são características destas lesões ^{6, 29} (Tabela 1).

Os pólipos mistos correspondem a 0,7 e 1,5% de todos os pólipos e de 1,7 a 4,7% dos pólipos serrilhados ^{15, 18, 36, 37}. Os pólipos mistos têm pelo menos uma combinação de duas ou mais características de adenomas convencionais, adenomas serrilhados sésseis, adenomas serrilhados tradicionais ou pólipos hiperplásicos ³². A definição desta lesão é a combinação de um pólipó serrilhado (pólipó hiperplásico, adenoma serrilhado sésseil ou adenoma serrilhado tradicional) com um adenoma convencional ³³. O conhecimento destas lesões ainda é limitado, portanto, não se sabe se esta morfologia é distinta das outras lesões serrilhadas e se existe alguma implicação clínica na detecção destas lesões, entretanto, os pólipos mistos são provavelmente originados do desenvolvimento natural dos pólipos serrilhados ³³.

1.3. Vias genéticas da carcinogênese colorretal

O conhecimento das vias moleculares que são atuantes na evolução da lesão precursora ao câncer colorretal vem avançando. São conhecidas pelo menos quatro vias moleculares importantes de acordo com as alterações que ocorrem nas mesmas: instabilidade cromossômica (CIN) (responsável pela sequência adenoma–carcinoma), instabilidade microssatélite (MSI), *metilator phenotype* (CIMP), e a via do serrilhado²⁹. Estas diferentes vias moleculares de carcinogênese vão determinar diferenças na morfologia e histopatologia, e conseqüentemente diferentes fenótipos, prognóstico e opções de tratamento do câncer invasivo.

1.3.1. Via da instabilidade cromossômica: adenoma-carcinoma

Fearon e Vogelstein em 1990 foram os primeiros a descrever o desenvolvimento do câncer colorretal através de múltiplos passos onde a transformação da mucosa normal ao adenoma precoce e ao adenoma avançado e finalmente ao carcinoma invasivo é consequência do acúmulo de alterações genéticas em genes supressores de tumor e oncogenes causando uma instabilidade cromossômica¹². Neste modelo, a primeira etapa de transformação (mucosa normal-adenoma precoce) é resultado da mutação no gene supressor tumoral *adenomatous polyps coli* (APC)³⁸. Em condições fisiológicas, a proteína codificada pelo gene APC é responsável pela manutenção de níveis baixos da proteína β -catenina no núcleo, impedindo assim a transcrição de múltiplos genes pela β -catenina envolvidos na proliferação celular. APC selvagem forma um complexo com a proteína β -catenina favorecendo o seu transporte do núcleo ao citoplasma onde a mesma será degradada (42). Na presença de APC mutada, o complexo APC- β -catenina não pode ser formado, e a β -catenina não degradada, se acumula no núcleo e promove o crescimento e invasão tumoral³⁹ (Figura 6).

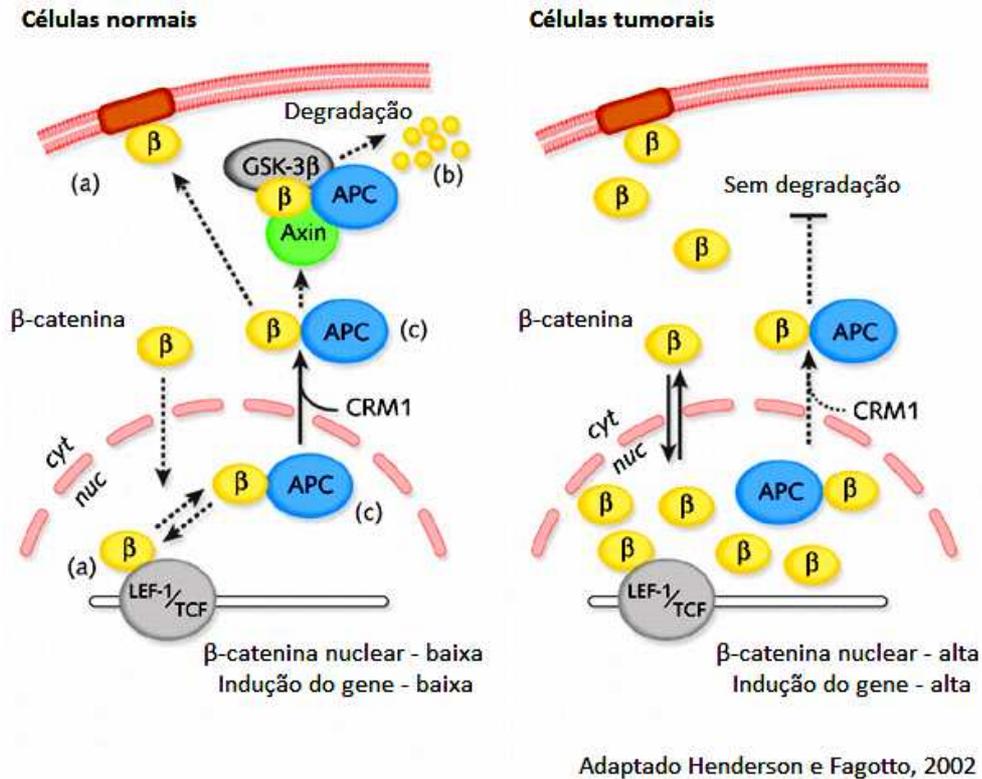


Figura 6 – APC/β-catenina. Células normais: com a formação do complexo APC/β-catenina, ocorre o transporte da β-catenina do núcleo para o citoplasma e manutenção dos seus níveis baixos, impedindo a indução de vários genes. Células tumorais: na presença de APC mutada não há formação do complexo APC/β-catenina, e a ausência de degradação de β-catenina resulta no aumento dos seus níveis no núcleo e a transcrição gênica⁴⁰

Para ocorrer a fase seguinte da carcinogênese colorretal (adenoma precoce em adenoma avançado), é necessária a mutação no oncogene *KRAS*, que é um dos oncogenes pertencentes à família RAS e alvo de mutações somáticas em muitos tipos de câncer, incluindo o colorretal⁴. *RAS* codifica uma quinase que pertence à cascata de sinalização das *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) que inclui mediadores da sinalização celular culminando na proliferação celular, apoptose e diferenciação⁴¹. Mutações pontuais em *KRAS* ocorrem nos códons 12 e 13 do éxon 2 e menos frequentemente no códon 61 do éxon 3, e induzem a fosforilação da enzima guanina difosfato levando à ativação contínua da via da sinalização da via MAPK (Figura 7).

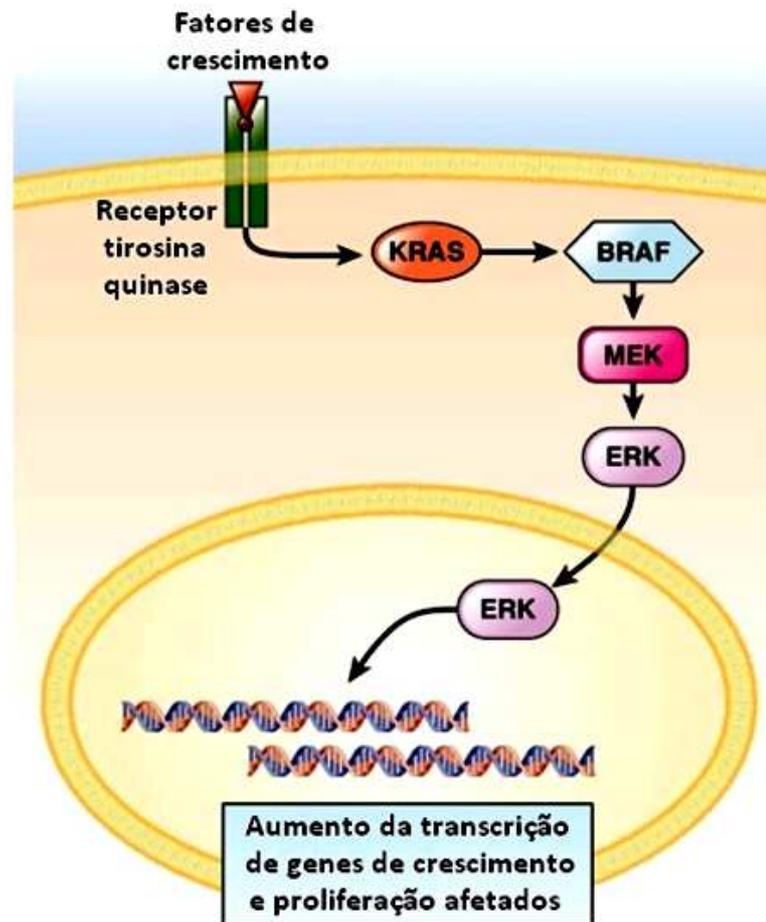
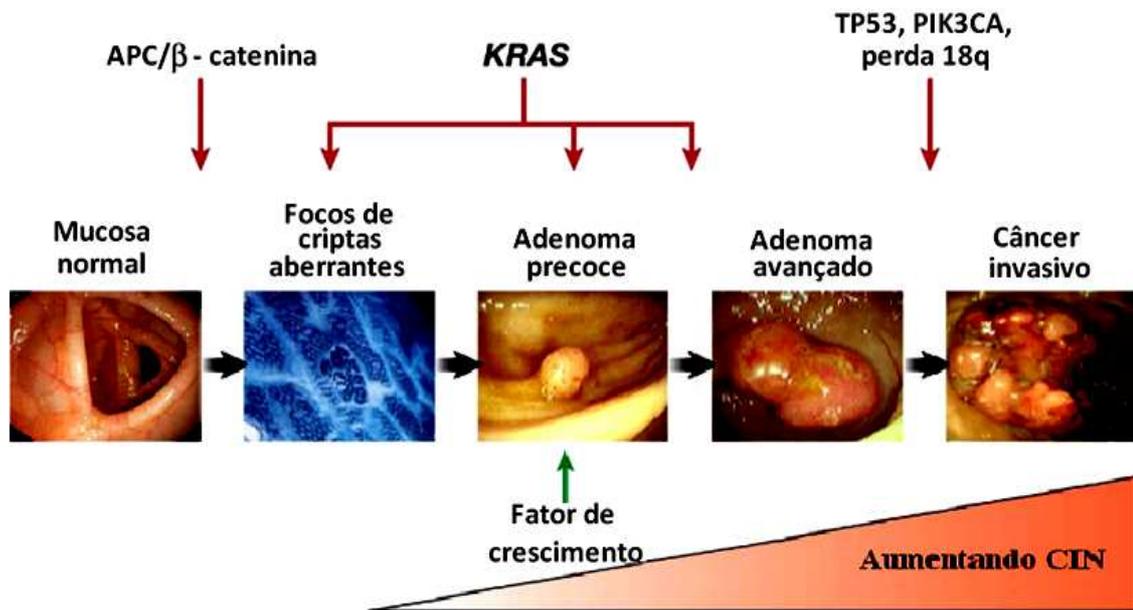


Figura 7 - Via das mitogen-activated protein kinases (MAPK) ²⁹

Mutações em *KRAS* ocorrem em 7,3 a 9,3% dos adenomas convencionais ^{18, 42} e aproximadamente 40% dos adenocarcinomas, sendo as mais comuns a G12D, G12V e G13D ^{4, 43-45} (25). Apesar da sua importância, mutação no oncogene *KRAS* não é suficiente para o desenvolvimento do câncer, havendo necessidade de alterações genéticas em genes supressores de tumor tais como o gene *TP53* e oncogenes como o *PIK3CA* (Figura 8) ^{4, 46}.



Adaptado PINO & CHUNG, Gastroenterology, 2010

Figura 8 - Evolução da sequência adenoma-adenocarcinoma. CIN- instabilidade cromossômica ⁴⁶

O *TP53* é conhecido como o guardião do genoma, pois impede a proliferação celular quando há danos no DNA, estimulando o reparo do erro ou então induzindo a apoptose celular quando tal reparo não é possível ^{47, 48}. Quando ocorre mutação em *TP53*, este gene não é ativado quando ocorre um dano no DNA, o que impossibilita a correção dos erros, permitindo o acúmulo de outras mutações e consequentemente, o crescimento das células tumorais ^{4, 49}. Mutações em *TP53* são observadas em aproximadamente 70% dos cânceres colorretais ^{4, 6}.

1.3.2. Via do serrilhado

Na sequência adenoma-adenocarcinoma, os pólipos hiperplásicos eram descritos como lesões não neoplásicas “inofensivas” sem potencial de malignidade ^{12, 28, 50}. Entretanto, com a descrição da via do serrilhado como a segunda principal via que leva ao desenvolvimento do câncer colorretal, os pólipos hiperplásicos foram reconhecidos como possíveis lesões precursoras por poderem evoluir para outras lesões serrilhadas e então para o câncer colorretal. Apenas uma pequena porcentagem de pólipos hiperplásicos poderiam progredir para o câncer ^{20, 50-52}. Desde a mucosa normal, a evolução desta via seria de pólipos hiperplásicos para adenomas serrilhados sésseis ou para adenomas serrilhados tradicionais ou pólipos mistos e então para o carcinoma (Figura 9). Tem sido proposto que os pólipos

hiperplásicos progrediriam para os adenomas serrilhados sésseis em um intervalo estimado de 7,5 anos⁵³.

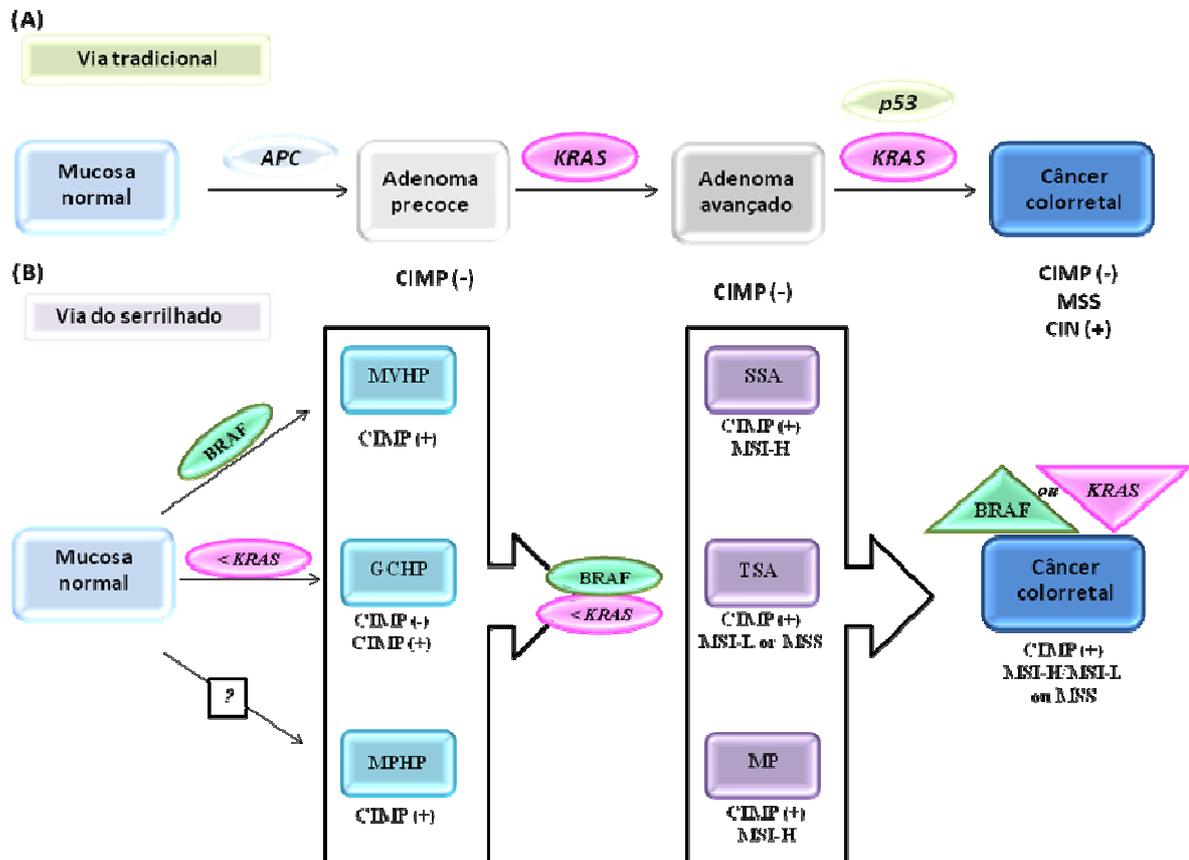


Figura 9 – Esquema das vias da carcinogênese colorretal. (A) Via tradicional da evolução adenoma-adenocarcinoma. (B) Via do serrilhado da sequência pólipó serrilhado-adenocarcinoma

As alterações genéticas que ocorrem na via do serrilhado ainda não estão tão bem esclarecidas como estão na sequência adenoma–carcinoma e há grandes variações na frequência das alterações moleculares até o momento descritas. As alterações genéticas mais frequentes envolvem mutações em *KRAS* e *BRAF*.

Mutações em *KRAS* são observadas em 0 a 73% dos pólipos serrilhados, 6 a 73% dos pólipos hiperplásicos, 7 a 25% dos adenomas serrilhados sésseis^{18, 20, 28, 42, 51, 53, 54} e em 0 a 28% dos adenomas serrilhados tradicionais^{18, 42} e em 0 a 45,2% dos adenocarcinomas serrilhados^{45, 54} (Tabela 2). Assim como na clássica sequência adenoma-adenocarcinoma, as mutações *KRAS* mais frequentes são G12D, G12V e G13D¹⁸.

Tabela 2 - Frequência de alterações moleculares nos pólipos serrilhados e adenocarcinomas serrilhados

Autores	Alterações moleculares	Pólipos serrilhados						Carcinoma
		HP			SSA	TSA	MP	ADC serrilhado
		MVHP	GCHP	MPHP				
Kim et al., 2011 ²⁸	<i>KRAS</i>	16,7%	72,7%	25,0%	12,5%	Na	Na	Na
	<i>BRAF</i>	66,7%	0,0	25,0%	60,7%	Na	Na	Na
	MSI-H	Na	Na	Na	1,8%	Na	Na	Na
Sandmeier et al, 2009 ⁵¹	<i>KRAS</i>		17,0%		25,0%	Na	Na	Na
	<i>BRAF</i>		83,0%		63,0%	Na	Na	Na
	MSI-H		0,0%		0,0%	Na	Na	Na
Kim et al., 2008 ⁴²	<i>KRAS</i>	6,0%	8,0%	Na	8,0%	17,0%	25,0%	Na
	<i>BRAF</i>	88,0%	75,0%	Na	81,0%	76,0%	75,0%	Na
	MSI-H	0,0%	0,0%	Na	0,0%	3,0%	0,0%	Na
O'Brien et al, 2006 ⁵⁴	<i>KRAS</i>	13,2%	42,9%	Na	6,9%	Na	Na	0,0%
	<i>BRAF</i>	76,3%	21,4%	Na	82,9%	Na	Na	82,0%
	MSI-H	0,0%	0,0%	Na	0,0%	Na	Na	81,8%
Spring et al, 2006 ¹⁸	<i>KRAS</i>	11,0%	50,0%	Na	8,0%	0,0%	43,0%	Na
	<i>BRAF</i>	70,0%	20,0%	Na	78,0%	66,0%	57,0%	Na
	MSI-H	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na
Konishi, et al 2004 ²⁰	<i>KRAS</i>		13,0%		8,0%	Na	22,7%	Na
	<i>BRAF</i>		Na		32,0%	Na	40,9%	Na
	MSI-H		8,0%		36,0%	Na	5,0%	Na
Yang et al, 2004 ⁵³	<i>KRAS</i>	13,2%	46,2%	Na	7,1%	28,0%	Na	Na
	<i>BRAF</i>	76,3%	23,1%	Na	82,1%	60,0%	Na	Na
	MSI-H	Na	Na	Na	Na	Na	Na	Na

HPs- hiperplásicos, MVHP - microvesiculares, GCHP - ricos em células caliciformes, MPHP- pobres em mucina; SSA- adenoma serrilhado séssil, TSA adenoma serrilhado tradicional, MP pólipo misto; NA – Não aplicável

Em relação ao *BRAF*, a mutação mais frequente é V600E (Val600Glu), que ocorre em 0 a 88,0% dos pólipos hiperplásicos, 32,0 a 82,9% dos adenomas serrilhados sésses, em 60,0 a 76,0% dos adenomas serrilhados tradicionais^{18, 20, 28, 42, 53-55} e em 33,3 – 81,8% dos adenocarcinomas serrilhados, e vem sendo considerada como um marcador específico dos adenocarcinomas serrilhados^{45, 54}.

Mutações em *BRAF* são mais frequentes do que mutações em *KRAS* nos pólipos hiperplásicos microvesiculares e adenomas serrilhados sésseis^{18, 20, 28, 53, 54}. Por outro lado, entre os pólipos hiperplásicos ricos em células caliciformes, as mutações em *KRAS* são as alterações genéticas mais incidentes^{18, 54}. Mutações em ambos oncogenes são frequentemente descritas como eventos exclusivos tanto nos adenocarcinomas serrilhados quanto nas lesões precursoras serrilhadas.

1.3.3. Outras vias moleculares

Além das alterações descritas acima, outros dois mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento das lesões precursoras do câncer colorretal são instabilidade de microssatélite (MSI) e *CpG island methylator phenotype* (CIMP)^{25, 56, 57}.

Microssatélites são sequências repetitivas de 1 a 6 nucleotídeos distribuídas ao longo de todo o genoma humano⁵⁸. O sistema de reparo de DNA (*mismatch repair* – MMR), inclui proteínas MLH1, MLH2, MSH3, MSH6 e PMS2, e é responsável pela correção dos erros de emparelhamento de nucleotídeos que ocorrem durante a replicação do DNA. Regiões ricas em sequências microssatélites são mais susceptíveis a este tipo de erro, dando origem a deleções ou inserções de nucleotídeos^{59, 60}. Deficiências no sistema de reparo MMR leva ao acúmulo de erros do DNA (mutações com deleção ou inserção de nucleotídeos) e consequentemente em instabilidade de microssatélites. O *status* de MSI pode ser classificado de acordo com os marcadores que mostram instabilidade²⁰. Para tal, foi proposto o painel de Bethesda, que é composto por cinco marcadores, sendo dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D5S346, D2S123 and D17S250)^{8, 61}. Mais recentemente, um painel de 5 marcadores incluindo os anteriores BAT25 e BAT26, e mais três outros marcadores mononucleotídeos (NR21, NR22 e NR24) tem sido utilizado para determinar o fenótipo de MSI em tumores⁹. O fenótipo ou *status* de MSI de um tumor pode então ser classificado como: alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), baixa instabilidade de microssatélites (MSI-L) e microssatélite estáveis (MSS)⁸.

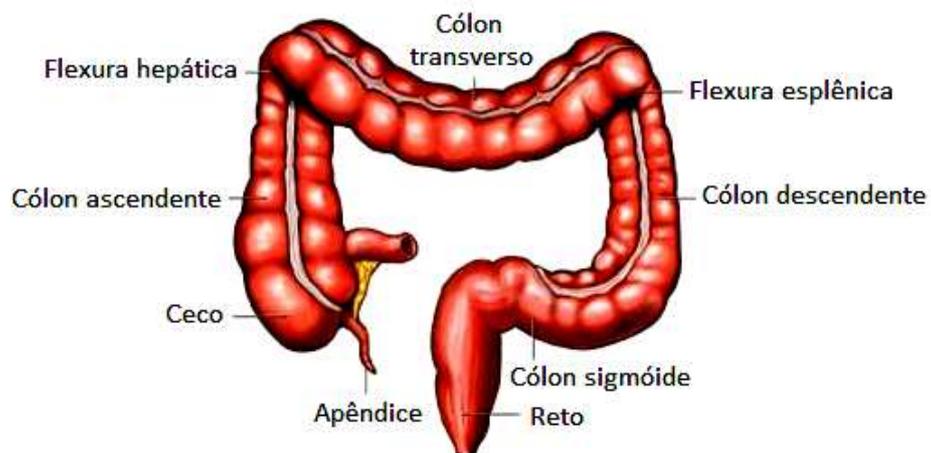
A MSI é um marcador de câncer colorretal hereditário não polipose (HNPCC) ou síndrome de Lynch⁸. No entanto, cerca de 15% de cânceres colorretais esporádicos desenvolvem ao longo da via de MSI. Em 1999, Lino et al reportaram que a frequência de MSI foi significativamente maior nos pólipos serrilhados do que nos adenomas convencionais³⁷. Os autores observaram que um subgrupo de adenomas serrilhados (11,7%) e pólipos

mistos (25%) tinham MSI-H e todos os pólipos hiperplásicos tinham MSI-L. Tais resultados podem sugerir que pólipos hiperplásicos com MSI-L podem ser precursores de um pequeno grupo de câncer colorretal com MSI-L ³⁷. O *status* de MSI está frequentemente associado a mutações nos oncogenes *KRAS* e *BRAF* ^{56, 57, 62, 63}.

Outra alteração que pode ocorrer durante a carcinogênese colorretal é o fenótipo de metilação (CIMP). As lesões precursoras do câncer colorretal com CIMP mostram um fenótipo histológico distinto dos adenomas clássicos ⁴. CIMP foi associado a uma maior incidência de pólipos serrilhados no cólon proximal e altos índices de metilação em *loci* específicos facilitam a transição de pólipo hiperplásico microvesicular para adenoma serrilhado séssil ²⁹.

1.4. Da clínica ao estadiamento

A maioria dos cânceres colorretais está localizada no cólon esquerdo, principalmente no cólon sigmóide e no reto (Figura 10) ⁵.



Adaptado de <http://www.crcftlauderdale.com>

Figura 10 – Segmentos do cólon

Os pacientes com câncer colorretal podem ter anemia decorrente do sangramento do tumor. Além disto, estes pacientes podem ter constipação, e ainda manifestar distensão abdominal, perda de peso, fadiga, obstrução ou perfuração do intestino ⁶⁴. Alguns pacientes com câncer colorretal são assintomáticos, e nestes casos a neoplasia pode vir a ser detectada através de rastreamento ou vigilância ⁶⁴. O diagnóstico do câncer colorretal pode

ser realizado através de exames de imagem, que permitem além da detecção, o estadiamento clínico. A colonoscopia, além da detecção da lesão neoplásica, permite a detecção de lesões sincrônicas e a biópsia do tumor para o diagnóstico histopatológico em um mesmo procedimento ⁶⁴.

Dentre os cânceres colorretais esporádicos, mais de 90% são adenocarcinomas e as suas variantes histopatológicas incluem o carcinoma medular, o micropapilar (variante rara, podendo ser um componente do carcinoma convencional), mucinoso (> de 50% da lesão é composta de *pools* de mucina extracelular), o de células em anel de sinete (> de 50% das células tumorais composta de mucina intracitoplasmática) e o adenocarcinoma serrilhado ⁶. Este último é consequência final da progressão de uma lesão serrilhada em 30% dos cânceres colorretais e tem na sua arquitetura, morfologia serrilhada em 1/3 dos casos ⁶⁵. Tal padrão serrilhado não é observado em carcinomas serrilhados pouco diferenciados, pois nestes o padrão de crescimento é trabecular ⁶⁵ (Figura 11).

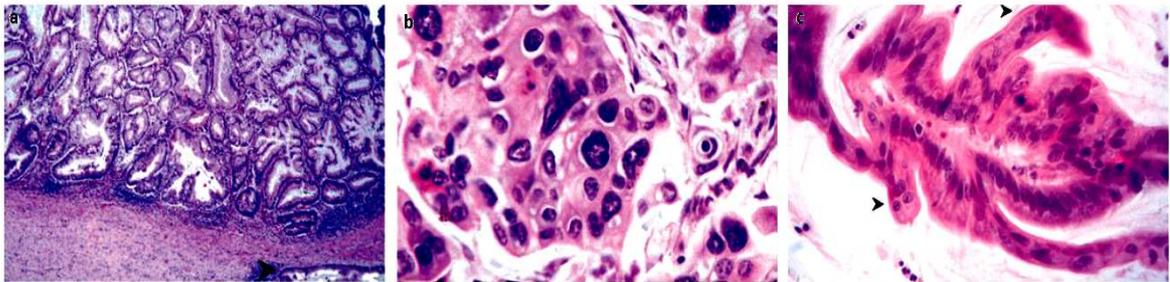


Figura 11 – Adenocarcinoma serrilhado. (a) Adenocarcinoma serrilhado bem diferenciado com padrão de crescimento serrilhado; (b) Adenocarcinoma serrilhado pouco diferenciado com padrão de crescimento trabecular; (c) Adenocarcinoma serrilhado com muco ²⁵

O câncer colorretal é graduado histologicamente baseado na porcentagem de arquitetura glandular, podendo ser bem (> 95% de arquitetura glandular), moderadamente (50- 95% de arquitetura glandular), ou pouco diferenciado (0-49% de arquitetura glandular) ⁶ (Figura 12).

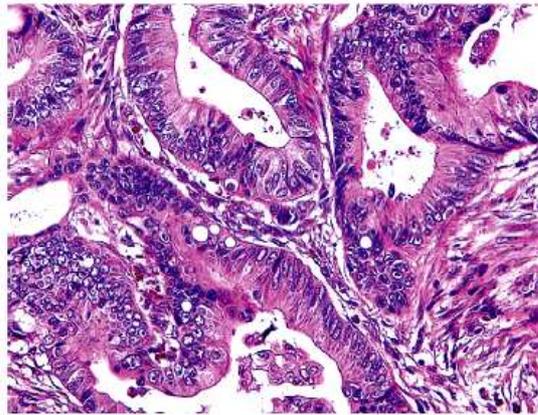


Figura 12 – Adenocarcinoma bem diferenciado²³

O estadiamento do câncer colorretal se faz utilizando sistema TNM⁶⁶. Tal classificação leva em consideração a extensão do tumor primário, ausência ou presença de metástases em linfonodos regionais e ausência ou presença de metástase à distância⁶⁶. Desta maneira, é possível classificar o tumor nos estádios I a IV, sendo o último o estádio o mais avançado da doença⁶⁶ (Tabela 3).

Tabela 3 – Grupamento do câncer colorretal por estádios⁶⁶

Estádio	T	N	M
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1, T2	N0	M0
Estádio IIA	T3	N0	M0
Estádio IIB	T4	N0	M0
Estádio IIIA	T1, T2	N1	M0
Estádio IIIB	T3, T4	N1	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N2	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

1.5. Tratamento

Com a evolução da medicina e conseqüentemente de técnicas cirúrgicas, da radioterapia e da quimioterapia, houve um grande progresso no tratamento do câncer colorretal. O principal tratamento para esta neoplasia é a cirurgia, sendo na grande maioria com fim curativo⁵. O tratamento do câncer colorretal é dependente do estádio da doença.

Para cânceres colorretais estágio 0, recomenda-se ressecção endoscópica com margens livres e ressecção do cólon quando não for possível realizar a remoção endoscópica da lesão⁶⁷. Para cânceres colorretais estágio I, recomenda-se a ressecção ampla, associada à anastomose primária, criando desta maneira, um cólon funcional⁶⁷. Quando não é possível preservar o esfíncter anal devido à severidade do tumor, ou quando o mesmo é localizado próximo ao canal anal, é necessário realizar uma colostomia definitiva⁵. Durante a cirurgia é necessário remover e examinar pelo menos 12 linfonodos para realizar o estadiamento do câncer colorretal⁵. Pacientes com estágio III já têm comprometimento de linfonodos, sendo que pacientes com 1 a 3 linfonodos envolvidos têm melhor prognóstico comparado aqueles com 4 ou mais linfonodos comprometidos⁶⁷. O estágio IV do câncer colorretal apresenta metástase à distância, podendo ser feita ressecção cirúrgica local e ressecção de metástases no fígado, pulmão ou ovário, dependendo do paciente⁶⁷.

A quimioterapia pode ser realizada como complementação terapêutica com a cirurgia e/ou radioterapia, podendo ser indicada para a redução parcial do tumor antes da cirurgia (quimioterapia neoadjuvante) ou após o procedimento cirúrgico (quimioterapia adjuvante), com o objetivo de reduzir a probabilidade de metástases à distância. Ainda existem controvérsias com relação à recomendação da quimioterapia adjuvante pra câncer colorretal do estágio II, mas é recomendada para o estágio III, e quimioterapia paliativa é indicada para neoplasia do estágio IV. Atualmente existem pelo menos dez anti-neoplásicos aprovados pela FDA para o tratamento do câncer colorretal, tais como: oxaliplatina, leucovorina, fluorouracil, levamisol, capecitabina, irinotecano, bevacizumabe, cetuximabe, aflibercept e panitumumabe⁶⁷.

A radioterapia é mais indicada no tratamento do câncer de reto⁵. O *National Cancer Institute* recomenda a radioterapia paliativa para o câncer de cólon apenas para pacientes do estágio IV⁶⁷.

1.6 Prevenção do câncer colorretal

O conhecimento da história natural com a progressão das lesões precursoras ao câncer possibilita a aplicação de estratégias prevenção do câncer colorretal com a detecção e ressecção daquelas lesões com maior potencial de malignidade²³. Neste contexto, a estratificação de risco para o desenvolvimento do câncer colorretal é fundamental para

definir as estratégias de prevenção do câncer colorretal, direcionando as mesmas aos grupos de risco médio, aumentado ou elevado e excluindo os de baixo risco^{13, 68, 69}.

1.6.1. Estratificação de risco

O risco médio é caracterizado por pacientes com 50 anos ou mais que não tenham história de câncer colorretal ou adenomas, de doença inflamatória intestinal nem história familiar para câncer colorretal^{13, 68, 69}. O risco aumentado para esta neoplasia é definido por pacientes que têm história pessoal de pólipos (1 ou 2 adenomas com baixo grau de displasia, adenomas ou pólipos serrilhados), pacientes com câncer colorretal e pacientes com história familiar de câncer colorretal ou adenoma (um parente de primeiro grau antes dos 60 anos ou em 2 ou mais familiares de primeiro grau em qualquer idade)^{13, 68, 69}. Pacientes considerados como de alto risco são aqueles que têm diagnóstico ou suspeita de PAF, diagnóstico genético ou clínico de HNPCC ou doença inflamatória intestinal^{13, 68, 69}.

1.6.2. Detecção das lesões precursoras

A colonoscopia tem sido o principal método para detecção e ressecção das lesões precursoras durante o rastreamento do câncer colorretal em pacientes de médio risco e na vigilância do câncer colorretal em indivíduos com risco aumentado. Estudos observacionais e caso-controle estimaram que a colonoscopia leva a uma redução da incidência e da mortalidade do câncer colorretal^{17, 70, 71}. A colonoscopia permite, em um mesmo procedimento, a visualização direta da mucosa ao longo de todo do cólon e realização de biópsias e polipectomias. Algumas técnicas podem se associar a colonoscopia convencional para aumentar a chance de detecção das lesões. Por exemplo, a utilização de corantes (como por exemplo, índigo carmim) aumenta o contraste da neoplasia comparado à mucosa normal, facilitando a definição do padrão de criptas e a caracterização de adenomas planos e polipóides⁷². Além disto, avanços nas tecnologias de imagem como colonoscopia de alta definição com cromoendoscopia digital também podem melhorar a taxa de detecção das lesões precursoras⁷³⁻⁷⁶. Contudo, acredita-se que até 26% de adenomas e 2% de adenomas avançados não são detectados através de colonoscopia⁷⁷. Por isso, novas estratégias mais sensíveis e menos invasivas, tais como a aplicação de testes moleculares baseados em alterações genéticas, epigenéticas e proteômicas, e sua detecção no sangue, urina, e fezes, tem sido estudadas com o objetivo de melhorar o rastreamento do câncer colorretal⁷⁸.

Testes moleculares de DNA fecal ainda não são usualmente recomendados, visto que não existem evidências suficientes que demonstram os benefícios e definem o intervalo do teste. De qualquer forma, um dos maiores desafios para incluir os testes moleculares no rastreamento colorretal é a identificação de biomarcadores relevantes, confiáveis e reprodutíveis. Neste contexto, o estudo das lesões precursoras do câncer colorretal desempenha grande importância na elucidação das vias moleculares da carcinogênese colorretal com a perspectiva do uso destas informações na detecção precoce e prevenção do câncer colorretal.

2. JUSTIFICATIVAS

2.1. Necessidade de se conhecer os subgrupos moleculares e morfológicos das lesões precursoras do câncer colorretal na população Brasileira para tornar o rastreamento e a prevenção deste câncer mais adequados;

2.2. Grande variabilidade na literatura da frequência de mutações em *KRAS* e *BRAF* e *status* de MSI nas lesões precursoras do câncer colorretal e desconhecimento das suas frequências na população Brasileira.

3. OBJETIVOS

- 3.1. Determinar a frequência de mutações dos oncogenes *KRAS* e *BRAF* nas lesões precursoras do câncer colorretal.
- 3.2. Avaliar a presença de instabilidade de microssatélite (MSI) nas lesões precursoras do câncer colorretal.
- 3.3. Avaliar a associação entre as alterações moleculares, histológicas, e endoscópicas das lesões colorretais.
- 3.4. Investigar as mesmas alterações moleculares no câncer colorretal e comparar com as encontradas nas lesões precursoras.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Entre Janeiro a Outubro de 2011, 155 pacientes (>50 anos) encaminhados para o Departamento de Endoscopia do Hospital de Câncer de Barretos, para realizar colonoscopia foram prospectivamente incluídos neste estudo. A maioria dos pacientes (52,7%) era classificada com risco aumentado para câncer colorretal e tinham como indicação de colonoscopia a vigilância pós colectomia por câncer colorretal ou polipectomia. Pacientes com câncer colorretal hereditário ou história familiar de câncer colorretal associado a síndromes hereditárias ou a doenças inflamatórias intestinais, foram excluídos. Para análise comparativa das alterações moleculares, 47 pacientes com adenocarcinoma colorretal esporádico foram retrospectivamente e aleatoriamente selecionados através da busca no arquivo do Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Institucional (415/2010) (Anexo A). Todos os dados coletados foram inseridos em uma ficha clínica (Anexo B).

4.2. Método endoscópico e lesões

Todas as colonoscopias foram realizadas com endoscópicos de alta resolução (Fujinon 4400 e Olympus 180, Tokyo, Japão) utilizando cromoscopia com solução de indigo carmim a 0,4% direcionada às lesões encontradas. O ceco foi alcançado em todos os casos e todas as lesões detectadas foram ressecadas. Todos os exames foram realizados por dois médicos endoscopistas, experientes na área. As lesões foram classificadas de acordo com a classificação de Paris [tipo 0-I: polipóide (0-Is: séssil; 0-Isp: misto; 0-Ip: pediculado); tipo 0-II: não polipóide (0-IIa: levemente elevada; 0-IIb: levemente deprimida; 0-IIc: escavada) e tipo 0-III: não polipóide, com úlcera franca; LST – padrão de crescimento lateral)]^{22, 23}. A localização e o tamanho de cada lesão foram relatados. Para fins das análises, as lesões localizadas no ceco, cólon ascendente e cólon transversal foram consideradas como de cólon direito, e aquelas do cólon descendente, sigmóide e reto foram consideradas como do cólon esquerdo. Todas as lesões ressecadas durante a colonoscopia foram submetidas à análise histológica e reavaliadas por um patologista especialista na área gastrointestinal (C.S.-N), que não teve acesso à primeira classificação patológica, clínica ou molecular.

As lesões foram histologicamente classificadas de acordo com os critérios da OMS ⁶. A combinação de mais de um tipo histológico na mesma lesão foi considerada aqui como pólipos mistos, sendo especificados os componentes presentes. Adenomas avançados foram assim denominados se tivessem o tamanho de pelo menos 10mm ou com componente viloso ou com displasia de alto grau.

Para a análise molecular, 103 lesões (uma de cada paciente), foram aleatoriamente selecionadas a fim de ter uma distribuição homogênea dos diferentes tipos histológicos. Entretanto, diante do pequeno número de casos, todos os adenomas serrilhados e adenomas serrilhados tradicionais foram incluídos na análise molecular.

4.3. Extração de DNA

Cortes de parafina de 5 µm foram obtidas a partir dos blocos de parafina de cada lesão incluída. O DNA foi isolado a partir de uma lâmina de cada lesão. Os tecidos foram desparafinizados a 80°C seguidos por uma série de lavagens com xilol e etanol (100, 70 e 50%). Utilizando uma lâmina corada com hematoxilina e eosina (H & E) a área do tumor ou da lesão precursora foi delimitada pelo patologista, e macrodissecada utilizando uma agulha estéril (18G x 1 1/2) (BD, Curitiba, Brasil) e cuidadosamente transferida para um microtubo. O DNA foi extraído utilizando o QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O DNA foi quantificado e qualificado através do Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) e posteriormente diluído para uma concentração final de 50 ng/µL. Amostras de DNA foram armazenadas a -20°C para posteriores análises moleculares.

4.4. Análise mutacional de *KRAS* e *BRAF*

As regiões de *hotspots* dos oncogenes *KRAS* (códon 12 e 13 do éxon 1) e *BRAF* (códon 600 do éxon 15) foram analisadas através da reação em cadeia da polimerase (PCR), seguido por sequenciamento direto como previamente descrito por nosso grupo ^{79, 80}.

Para *KRAS*, a reação de PCR foi realizada com um volume final de 15 µL, sob as seguintes condições: 1,5 µL tampão (Qiagen, Hilden, Alemanha); 2 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha); 100mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA); 0,2 mM de primers, senso e anti-senso (Sigma Aldrich, St. Louis, USA), 1 unidade de HotStarTaq DNA polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha) e 1 µL de DNA. Os primers para *KRAS* utilizados foram:

GTGTGACATGTTCTAATATAGTCA (senso) e GAATGGTCCTGCACCAGTAA (antisenso)⁷⁹. A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) utilizando Taq polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha). Os produtos da PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose. Para *BRAF* a reação de PCR foi realizada com um volume final de 15 µL, sob as seguintes condições: 1,5 µL tampão (Qiagen, Hilden, Alemanha); 2 mM MgCl₂ (Qiagen, Hilden, Alemanha); 100mM dNTPs (Invitrogen, Carlsbad, USA); 0,3 mM de primers senso e antiseno (Sigma Aldrich), 1 unidade de HotStarTaq DNA polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha) e 1 µL de DNA. Os primers para *BRAF* utilizados foram: TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA (senso) e GGCCAAAATTTAATCAGTGGA (antiseno)^{79, 80}. A PCR foi realizada em um termociclador Veriti (Applied Biosystems, USA) utilizando Taq polimerase (Qiagen, Hilden, Alemanha), onde os produtos de PCR foram avaliados através de eletroforese em gel de agarose.

Os produtos da PCR de cada éxon analisado foram primeiramente purificados com Exo-Sap (GE Technology, Cleveland, USA), então, os produtos da PCR foram submetidos a uma reação de sequenciamento utilizando 1 µL de BigDye (Applied Biosystems, USA), 1,5 µL de tampão para sequenciamento (Applied Biosystems, USA) e 1 µL de primer. A reação de sequenciamento foi seguida por purificação pós-sequenciamento com EDTA, álcool e citrato de sódio. Os produtos da PCR foram eluídos em HiDye (formamida) e incubados a 95°C por 5 minutos e posteriormente a -4°C por pelo menos 5 minutos. O sequenciamento direto foi realizado no *3500 series Genetic Analyzer* (Applied Biosystems, USA).

Todas as amostras com mutação foram confirmadas pelo menos duas vezes com uma nova reação de PCR e sequenciamento direto. Além disto, para controle de qualidade, em 10% dos casos uma nova extração de DNA com posterior análise de mutação foi realizada.

4.5. Análise de MSI

A avaliação de MSI foi realizada utilizando PCR multiplex compreendendo cinco marcadores mononucleotídeos quasimonormórficos (NR27, NR21, NR24, BAT 25 e BAT26), como previamente descrito pelo nosso grupo^{81, 82}. O *status* de MSI da lesão foi analisado utilizando o *software* GeneMapper 4.1 (Applied Biosystems, USA). Casos exibindo instabilidade em dois ou mais marcadores foram considerados como alta instabilidade de microsátélites (MSI-H), aqueles com instabilidade em um marcador foi definido como tendo baixa instabilidade de microsátélites (MSI-L), e finalmente aqueles que não mostraram

instabilidade em um marcador foram definidos como microsátélites estáveis (MSS). Em casos com MSI-H, o DNA foi extraído de tecido normal adjacente e a instabilidade dos marcadores foi analisada. O DNA de linhagem celular HCT15 (MSI-H) e DNA de pessoas saudáveis (MSS) foram utilizados como controle positivo e negativo, respectivamente. Análises de amostra com perfil anormal foram repetidas duas vezes.

4.6. Análises estatísticas

Análises estatísticas foram realizadas no programa SPSS para windows, na versão 19.0. Foram realizadas as análises descritivas do estudo, cujas variáveis analisadas foram características demográficas, indicação da colonoscopia, morfologia, tamanho, localização, classificação de Paris, histopatologia e alterações moleculares das lesões. A associação entre as variáveis foi analisada utilizando o teste exato de Fischer ou o teste do qui-quadrado, e o nível de significância foi de 0,05.

O número de lesões precursoras incluídas neste estudo foi baseado no cálculo do tamanho amostral, que foi fundamentado em três estudos ^{15, 18, 42}, onde foi comparada a prevalência de mutações *KRAS* e *BRAF* nos adenomas convencionais e nos pólipos serrilhados. Baseado nas prevalências dos estudos, calculamos o tamanho amostral, considerando significância de 0,05 e variando o poder do teste (Tabela 4).

Tabela 4: Tamanho de amostra para ensaios clínicos comparando a incidência de adenomas convencionais com lesões serrilhadas considerando 0,05 de significância.

	Estudo	Adenomas convencionais (%)	% Pólipos Serrilhados (%)	Poder do Teste	
				=0,9	=0,8
KRAS	KIM 2008	9	10	18050	13581
	SPRING 2006	7	27	69	52
BRAF	CARR 2009	5	64	9	7
	KIM 2008	0	80	3	2
	SPRING 2006	0,4	51,2	11	8

5. RESULTADOS

5.1. Características clínico-patológicas dos pacientes com lesões precursoras do câncer colorretal

Um total de 342 lesões foi endoscopicamente ressecado de 82 (52,9%) homens e 73 (47,1%) mulheres com uma média de 66 anos (desvio padrão - 9,3). A principal indicação para colonoscopia foi vigilância pós colectomia (36,4%) seguido por vigilância pós polipectomia (14,6%), câncer colorretal (12,6%) e dor abdominal (9,8%), embora em 12 casos a indicação para colonoscopia não tenha sido relatada (Tabela 5).

Tabela 5- Indicações para realização de colonoscopia dos pacientes com lesões precursoras do câncer colorretal

Indicação para colonoscopia *	n (%)
Vigilância pós colectomia	52 (36,4)
Vigilância pós polipectomia	21 (14,6)
Neoplasia colorretal	18 (12,6)
Dor abdominal	14 (9,8)
Sangramento	12 (8,4)
Prevenção	7 (4,9)
Alteração do hábito intestinal	6 (4,2)
Outras neoplasias	4 (2,8)
Outras	9 (6,3)

* Em 12 casos a indicação não foi relatada

Noventa e dois (59,4%) pacientes tiveram mais do que uma lesão, do mesmo ou de diferentes tipos histológicos (média 2,2 – desvio padrão - 1,5).

Na tabela 6 estão descritas as principais características endoscópicas e histopatológicas das lesões colorretais ressecadas por colonoscopia.

Tabela 6 – Características endoscópicas e histopatológicas das lesões precursoras do câncer colorretal

	Nº de lesões	%
Localização		
Cólon direito	160	46,8
Cólon esquerdo	182	53,2
Morfologia *		
Polipóide	285	87,4
0-Is	257	78,9
0-Isp	21	6,4
0-Ip	7	2,1
Não polipóide	41	12,6
0-IIa	34	10,5
LST	7	2,1
Tamanho #		
< 10mm	305	90,2
≥10mm	33	9,8
Tipo histológico		
Adenomas	240	70,2
Tubular	226	66,1
Túbulo-viloso	14	4,1
Serrilhado	102	29,8
Pólipo hiperplásico	84	24,5
MVHP	50	14,6
GCHP	34	9,9
SSA	13	3,8
TSA	2	0,6
MP	3	0,9

MVHP – pólipo hiperplásico microvesicular; GCHP –pólipo hiperplásico rico em células caliciformes, SSA –adenoma serrilhado séssil; TSA – adenoma serrilhado tradicional; LST – tumor com padrão de crescimento lateral

* Em 16 lesões a classificação morfológica não pode ser descrita; # em 4 lesões o tamanho exato não pode ser relatado.

Displasia de alto grau foi detectada em 13 (5,4%) dos 240 adenomas e quarenta e quatro (18,3%) lesões foram classificadas como adenomas avançados. Os pólipos mistos foram adenoma tubular com displasia de baixo grau + pólipo hiperplásico rico em células

caliciformes, adenoma tubular com displasia de baixo grau + pólipo hiperplásico microvesicular e pólipo hiperplásico microvesicular + pólipo hiperplásico rico em células caliciformes.

Na figura 13 estão mostradas imagens histológicas de casos representativos incluídos neste estudo.

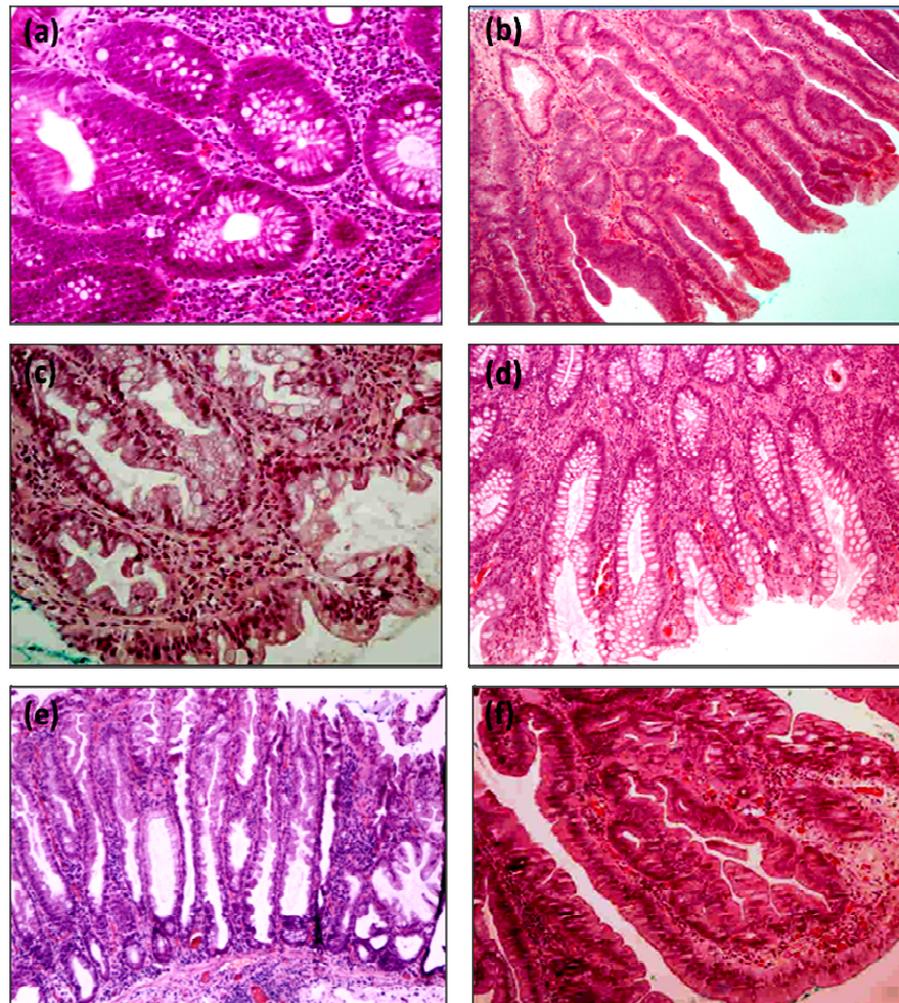


Figura 13 – Fotos obtidas a partir de lâminas coradas por Hematoxilina/Eosina (HE) de casos representativos de lesões precursoras. (a) Adenoma tubular com displasia de baixo grau (200x); (b) Adenoma tubulo-viloso com displasia de baixo grau (200x); (c) Pólipo hiperplásico microvesicular (MVHP) (200x); (d) Pólipo hiperplásico rico em células caliciformes (100x); (e) Adenoma serrilhado séssil (100x); (f) Adenoma serrilhado tradicional (100x)

A tabela 7 mostra a associação entre as características endoscópicas dos diferentes tipos histológicos. Em virtude da diferença no potencial maligno, para as análises de associação, os pólipos serrilhados foram estratificados em adenomas serrilhados (SSA e TSA)

e pólipos hiperplásicos. Devido à indefinição histopatológica, estes três casos não foram considerados nas análises de associação.

Os pólipos hiperplásicos foram predominantemente localizados no cólon esquerdo quando comparado aos adenomas e aos adenomas serrilhados ($p < 0,001$). O tipo não polipóide foi mais frequente nos adenomas serrilhados do que nos adenomas ou nos pólipos hiperplásicos, mas esta diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,060$). Uma associação significativa entre o tamanho da lesão e o tipo histológico foi observada. Lesões maiores ou iguais a 10mm foram mais comuns entre os adenomas serrilhados do que entre os pólipos hiperplásicos ou adenomas ($p = 0,009$). Finalmente, não houve uma associação significativa entre o gênero ($p = 0,075$) e a idade ($p = 0,098$) e os tipos histológicos.

Tabela 7 – Associação entre os tipos histológicos e características endoscópicas das lesões precursoras do câncer colorretal

	Adenomas n (%)	Pólipos serrilhados		p
		Adenomas serrilhados n (%)	Pólipos hiperplásicos n (%)	
Localização				
Cólon direito	130 (54,2)	7 (46,7)	22 (26,2)	<0,001
Cólon esquerdo	110 (45,8)	8 (53,3)	62 (73,8)	
Morfologia				
Polipóide	203 (88,6)	10 (66,7)	69 (87,3)	0,060
Não-polipóide	26 (11,4)	5 (33,3)	10 (12,7)	
Tamanho				
<10mm	211 (88,3)	12 (80,0)	79 (97,5)	0,009
≥10mm	28 (11,7)	3 (20,0)	2 (2,5)	

5.2. Alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal

Após a caracterização morfológica de todas as lesões, foram selecionadas 103 lesões (uma de cada paciente), consistindo de 50 adenomas e 53 pólipos serrilhados (13 adenomas

serrilhados sésseis, 2 adenomas serrilhados tradicionais e 38 pólipos hiperplásicos) para análise de mutação *KRAS* e *BRAF* e *status* de MSI.

Em relação ao *status* de MSI, nenhuma das lesões precursoras exibiu o fenótipo de MSI-H (Tabela 8).

Mutações *KRAS* e *BRAF* foram detectadas em 14 (13,6%) e 9 (8,7%) das 103 lesões, respectivamente e foram eventos mutuamente exclusivos. A frequência e a descrição das mutações *KRAS* e *BRAF* dentro dos vários tipos de lesões precursoras colorretais estão demonstradas nas Tabelas 8 e 9.

Tabela 8 – Tipos histológicos e frequência de mutações entre as lesões precursoras do câncer colorretal

Tipo histológico	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	MSI	
	Mutados	Mutados	MSI-L	MSI-H
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
Adenoma (n=50)	7 (14,0)	0 (0,0)	3 (6,0)	0 (0,0)
Tubular (n=44)	3 (6,8)	0 (0,0)	2 (4,5)	0 (0,0)
Túbulo-viloso (n=6)	4 (66,7)	0 (0,0)	1 (16,7)	0 (0,0)
Pólipos serrilhados (n=53)	7 (13,2)	9 (17,0)	1 (1,9)	0 (0,0)
Hiperplásicos (n=38)	7 (18,4)	3 (7,9)	0 (0,0)	0 (0,0)
MVHP (n= 18)	4 (22,2)	1 (5,6)	0 (0,0)	0 (0,0)
GCHP (n= 20)	3 (15,0)	2 (10,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Adenomas serrilhados (n=15)	0 (0,0)	6 (40,0)	1 (6,7)	0 (0,0)
SSA (n= 13)	0 (0,0)	4 (30,8)	0 (0,0)	0 (0,0)
TSA (n= 2)	0 (0,0)	2 (100,0)	1 (50,0)	0 (0,0)

MVHP – pólipo hiperplásico microvesicular; *GCHP* –pólipo hiperplásico rico em células caliciformes, *SSA* –adenoma serrilhado sésseis; *TSA* – adenoma serrilhado tradicional; *MSI* – instabilidade de microssatélites; *MSI-L* – baixa instabilidade de microssatélites; *MSI-H* – alta instabilidade de microssatélites

Tabela 9 - Características clínico-patológicas dos pacientes com mutação *KRAS/BRAF* entre as lesões precursoras do câncer colorretal

Paciente	Idade	Sexo	Indicação	Localização	Paris	Tamanho	Histologia	Códon	Tipo de mutação
Mutação <i>KRAS</i>									
19	71	F	Pós polipectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	Túbulo-viloso	12	Gly12Asp
8	71	M	Sangramento	Esquerdo	0-Isp	<10mm	Túbulo-viloso	12	Gly12Ser
14	82	M	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	Túbulo-viloso	12	Gly12Val
121	82	M	Neoplasia do reto	Direito	0-Is	<10mm	Túbulo-viloso	12	Gly12Asp
181	64	M	Pós polipectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	Tubular	12	Gly12Asp
151	76	M	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	Tubular	12	Gly1Val
40	77	M	Pós colectomia	Direito	0-Is	<10mm	Tubular	12 / 13	Gly12Ala + Gly13Asp
87	64	F	Pós polipectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	MVHP	13	Gly13Asp
70	64	F	Neoplasia do reto	Esquerdo	0-Is	<10mm	MVHP	12	Gly12Val
46	60	F	Pós colectomia	Esquerdo	0-IIa	<10mm	MVHP	12	Gly12Asp
208	73	M	Neoplasia do reto	Esquerdo	0-Is	<10mm	MVHP	12	Gly12Asp
17	70	F	NR	Esquerdo	0-IIa	<10mm	GCHP	12	Gly12Asp
68	76	M	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	GCHP	12	Gly12Asp
201	65	F	Neoplasia no cólon ascendente	Esquerdo	0-Is	<10mm	GCHP	12	Gly12Asp
Mutação <i>BRAF</i>									
105	61	F	NR	Direito	0-Is	<10mm	MVHP	600	Val600Glu
36	56	F	Dor abdominal	Direito	0-Is	<10mm	GCHP	600	Val600Glu
30	65	F	Pós colectomia	Direito	0-Is	≥10mm	GCHP	600	Val600Glu
64	72	M	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	≥10mm	TSA	600	Val600Glu
58	60	M	Pós polipectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	TSA	600	Val600Glu
59	89	F	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	SSA	600	Val600Glu
60	64	M	Dor abdominal	Direito	0-Is	<10mm	SSA	600	Val600Glu
64	70	M	Pós colectomia	Esquerdo	0-Is	<10mm	SSA	600	Val600Glu
249	73	F	Emagrecimento	Esquerdo	0-IIa	<10mm	SSA	600	Val600Glu

NR – Não relatado

A maioria das mutações *KRAS* foi encontrada no códon 12 (86,7%), sendo a mais frequente a Gly12Asp, observada em 8 casos (61,5%). Uma lesão teve duas mutações *KRAS* (Gly12Ala e Gly13Asp). Mutações *KRAS* foram encontradas em 7 (14,0%) dos 50 adenomas e em 7 (13,2%) dos 53 pólipos serrilhados. Ainda, mutações *KRAS* foram observadas em adenomas e em pólipos hiperplásicos, mas em nenhum adenoma serrilhado ($p=0,223$; Tabela 10). Todas as mutações *BRAF* foram V600E (Val600Glu). Mutações *BRAF* foram encontradas em 9 (17,0%) dos 53 pólipos serrilhados e em nenhum adenoma. Mutações em *BRAF* foram significativamente associadas com adenomas serrilhados quando comparados aos adenomas e aos pólipos hiperplásicos ($p < 0,001$; Tabela 10).

Em seguida as mutações *KRAS* e *BRAF* foram associadas com as características endoscópicas. Em relação à localização, 12 (85,7%) lesões com mutações *KRAS* foram localizadas no cólon esquerdo e apenas 2 (14,3%) no cólon direito, enquanto 52 (58,4%) lesões *KRAS* selvagem localizavam-se no cólon esquerdo e 37 (41,6%) no cólon direito ($p=0,05$; Tabela 11). Quanto à morfologia, a maioria das lesões precursoras com mutação *KRAS* foi polipóide e todas as lesões com esta mutação foram menores do que 10mm, mas não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 11). Não houve nenhuma associação entre o *status* de *BRAF* e a localização da lesão ($p=0,727$), morfologia da lesão ($p>0,999$) nem com o tamanho das mesmas ($p = 0,218$) (Tabela 11).

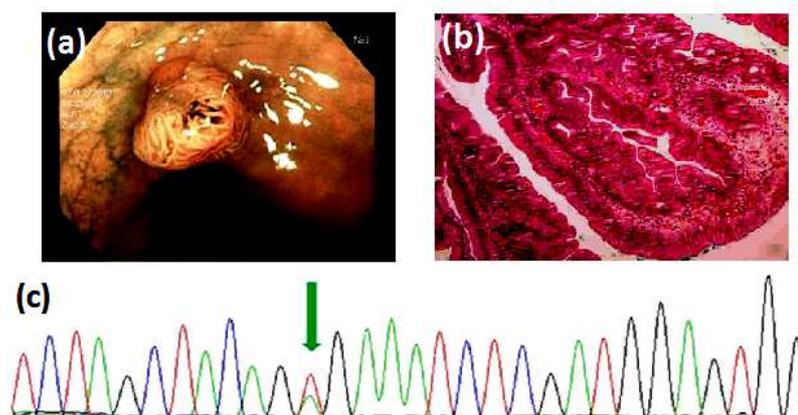


Figura 14 – Caso representativo de um adenoma serrilhado tradicional (TSA) com mutação *BRAF*, (a) visão endoscópica; (b) HE 200x com serrilhado complexo; (c) sequência parcial do gene *BRAF* com mutação V600E (seta).

Tabela 10 – Associação entre os tipos histológicos e as alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal

	Adenomas	Pólipos serrilhados		P	
		HP	SSA/TSA		
Mutação KRAS					
Mutados	14 (13,6)	7 (14,0)	7 (18,4)	0 (0,0)	0,223
Selvagem	89 (86,4)	43 (86,0)	31 (81,6)	15 (100,0)	
Mutação BRAF					
Mutados	9 (8,7)	0 (0,0)	3 (7,9)	6 (40,0)	<0,001
Selvagem	94 (91,3)	50 (100,0)	35 (92,1)	9 (60,0)	

HP- pólipio hiperplásico ; SSA/TSA –adenoma serrilhado séssil/adenomas serrilhado tradicional ; MSS - microssatélite estável; MSI –L – baixa instabilidade de microssatélites , MSI-H –alta instabilidade de microssatélites

Tabela 11 – Associação entre alterações moleculares e características endoscópicas das lesões precursoras do câncer colorretal

	KRAS		P	BRAF		P
	Selvagem	Mutados		Selvagem	Mutados	
Localização						
Cólon direito	37 (41,6)	2 (14,3)	0,050	35 (37,2)	4 (44,4)	0,727
Cólon esquerdo	52 (58,4)	12 (85,7)		59 (62,8)	5 (55,6)	
Morfologia						
Polipóide	71 (80,7)	12 (85,7)	0,999	75 (80,6)	8 (88,9)	0,999
Não Polipóide	17 (19,3)	2 (14,3)		18 (19,4)	1 (11,1)	
Tamanho						
<10mm	77 (88,5)	14 (100,0)	0,349	84 (91,3)	7 (77,8)	0,218
≥10mm	10 (11,5)	0 (0,0)		8 (8,7)	2 (22,2)	

Em seguida, as alterações moleculares em *KRAS* e *BRAF* foram associadas às características endoscópicas das lesões, desta vez, estratificadas por tipo histológico. No grupo de adenomas com mutação *KRAS*, a maioria foi localizada no cólon esquerdo (71,4%), todos foram polipóides e menores do que 10mm, mas não houve diferença estatisticamente

significativa (Tabela 12). Dentre os 50 adenomas, 15 (30,0%) foram classificados como adenomas avançados e 5 (33,3%) delas desenvolveram mutação *KRAS* enquanto entre os adenomas não avançados, apenas 2 (5,7%) demonstraram tal mutação ($p= 0,020$).

Tabela 12 – Associação entre as alterações em *KRAS* e as características endoscópicas no grupo dos adenomas

	<i>KRAS</i>		<i>P</i>
	Selvagem	Mutados	
Localização			
Cólon direito	19 (44,2)	2 (28,6)	0,684
Cólon esquerdo	24 (55,8)	5 (71,4)	
Morfologia			
Polipóide	35 (83,3)	7 (100,0)	0,573
Não Polipóide	7 (16,7)	0 (0,0)	
Tamanho			
<10mm	37 (86,0)	7 (100,0)	
≥10mm	6 (14,0)	0 (0,0)	0,576

No grupo dos pólipos hiperplásicos com mutação *KRAS*, 7 (100,0%) foram localizados no cólon esquerdo e nenhuma foi encontrada nos pólipos hiperplásicos do cólon direito, enquanto 20 (64,5%) lesões *KRAS* selvagem localizavam-se no cólon esquerdo e 11 (35,5%) no cólon direito ($p= 0,084$). Com relação à morfologia, dentre os pólipos hiperplásicos com mutação *KRAS*, 5 (71,4%) foram polipóides e 2 (28,6%) não polipóides, e 26 (83,9%) dos pólipos hiperplásicos *KRAS* selvagem eram polipóides e 5 (16,1%) não polipóides ($p= 0,592$). Sete (100,0%) dos pólipos hiperplásicos com mutação *KRAS* e 28 (96,6%) *KRAS* selvagem foram menores do que 10mm. Nenhum pólipos hiperplásico com mutação *KRAS* foi maior do que 10mm e apenas 1 (3,4%) pólipos hiperplásico *KRAS* selvagem foi maior do que 10mm ($p= 0,999$, Tabela 13). Dentre os pólipos hiperplásicos com mutação *BRAF*, 3 (100,0%) foram localizados no cólon direito e nenhum foi encontrada no cólon esquerdo, enquanto 8 (22,9%) lesões *BRAF* selvagem localizavam-se no cólon direito e 27 (77,1%) no cólon

esquerdo ($p= 0,020$). Não houve associação entre o status de *BRAF* e a morfologia e o tamanho dos pólipos hiperplásicos , ($p= 0,999$, $p= 0,083$, respectivamente, Tabela 13

Tabela 13 – Associação entre as alterações em *KRAS* e *BRAF* e as características endoscópicas no grupo dos pólipos hiperplásicos

	<i>KRAS</i>		<i>P</i>	<i>BRAF</i>		<i>P</i>
	Selvagem	Mutados		Selvagem	Mutados	
Localização						
Cólon direito	11 (35,5)	0 (0,0)	0,084	8 (22,9)	3 (100,0)	0,020
Cólon esquerdo	20 (64,5)	7 (100)		27 (77,1)	0 (0,0)	
Morfologia						
Polipóide	26 (83,9)	5 (71,4)	0,592	28 (80,0)	3 (100,0)	0,999
Não Polipóide	5 (16,1)	2 (28,6)		7 (20,0)	0 (0,0)	
Tamanho						
<10mm	28 (96,6)	7 (100,0)	0,999	33 (100,0)	2 (66,7)	0,083
≥10mm	1 (3,4)	0 (0,0)		0 (0,0)	1 (33,3)	

Não houve associação entre a mutação de *BRAF* e as características endoscópicas no grupo dos adenomas serrilhados (Tabela 14).

Tabela 14 – Associação entre as alterações em *KRAS* e *BRAF* e as características endoscópicas no grupo dos adenomas serrilhados

	<i>KRAS</i>		<i>P</i>	<i>BRAF</i>		<i>P</i>
	Selvagem	Mutados		Selvagem	Mutados	
Localização						
Cólon direito	7 (46,7)	0 (0,0)	-	6 (66,7)	1 (16,7)	0,119
Cólon esquerdo	8 (53,3)	0 (0,0)		3 (33,3)	5 (83,3)	
Morfologia						
Polipóide	10 (66,7)	0 (0,0)	-	4 (44,4)	1 (16,7)	0,580
Não Polipóide	5 (33,3)	0 (0,0)		5 (55,6)	5 (83,3)	
Tamanho						
<10mm	12 (80,0)	0 (0,0)	-	7 (77,8)	5 (83,3)	0,999
≥10mm	3 (20,0)	0 (0,0)		2 (22,2)	1 (16,7)	

5.3. Associação entre as alterações moleculares das lesões precursoras do câncer colorretal e dos adenocarcinomas colorretais

Na sequência, foi comparada a frequência de alterações moleculares encontradas nas lesões precursoras do câncer colorretal com os achados moleculares em 47 cânceres colorretais. Todos os cânceres colorretais foram adenocarcinomas e as características clínico-patológicas estão detalhadas na Tabela 15.

Tabela 15 – Características clínico-patológicas dos adenocarcinomas colorretais

	Nº de pacientes	%
Média de idade (desvio padrão)	66 (7,5)	Na
Sexo		
Feminino	20	42,6
Masculino	27	57,4
Localização		
Cólon direito	25	53,2
Cólon esquerdo	22	46,8
Estádio TNM		
I	2	4,3
II	18	38,3
III	14	29,7
IV	13	27,6
Grau de diferenciação		
Bem	15	32,6
Moderado	27	58,7
Pouco	4	8,7
Tratamento neoadjuvante		
Não	39	83,0
Sim	8	17,0

Na – não aplicável

Mutações *KRAS* foram detectadas em 22 (46,8%) cânceres e mutações *BRAF* foram encontradas em 3 (6,5%) cânceres colorretais. A descrição das características clínicas e demográficas dos adenocarcinomas portadores de mutação *KRAS/BRAF* são observados na

tabela 15. A maioria das mutações *KRAS* estava localizada no códon 12 (81,8%). Dentre estas, a Gly12Asp foi a mais frequente (44,5%). Todas as mutações *BRAF* foram V600E (Val600Glu).

Não houve associação significativa entre a presença de mutações em *KRAS* e localização ($p= 0,861$), estadiamento ($p= 0,421$), grau de diferenciação ($p=0,610$) e com o tratamento neoadjuvante ($p=0,999$) (Tabela 16).

Mutação *BRAF* também não demonstrou nenhuma associação com as características clínicas, ou seja, estadiamento ($p= 0,561$), grau de diferenciação ($p=0,656$) nem com tratamento neoadjuvante (0,444) (Tabela 16).

MSI-H foi detectado em 5 (10,6%) cânceres colorretais.

Tabela 16 – Características clínico e demográficas dos pacientes com adenocarcinomas colorretais com mutação *KRAS*/*BRAF*

Paciente	Idade	Sexo	Localização	Estádio TNM	Diferenciação	Códon	Tipo de mutação
Mutação <i>KRAS</i>							
20	65	M	Esquerdo	IIB	Pouco	13	Gly13Asp
36	59	M	Direito	IIIB	Bem	12	Gly12Val
16	64	M	Direito	IIIB	Moderado	12	Gly12Asp
45	63	M	Esquerdo	IIIB	Pouco	13	Gly13Asp
42	64	M	Esquerdo	IV	Moderado	12	Gly12Ser
41	58	M	Direito	IIB	Moderado	12	Gly12Val
39	57	M	Direito	IIIC	Moderado	12	Gly12Asp
37	69	M	Esquerdo	IIIC	Moderado	12	Gly12Asp
34	60	F	Direito	IIA	Moderado	12	Gly12Val
32	76	F	Esquerdo	IIIB	Moderado	12	Gly12Asp
29	68	M	Esquerdo	IIIC	Moderado	12	Gly12Ala
28	58	M	Esquerdo	IIA	Pouco	12	Gly12Asp
26	60	M	Esquerdo	IIIB	Bem	12	Gly12Asp
24	65	M	Esquerdo	IV	Moderado	12	Gly12Ser
18	71	F	Direito	IIA	Moderado	12	Gly12Cys
12	82	F	Direito	IIA	Moderado	12	Gly12Asp
8	64	F	Direito	IV	Bem	12	Gly12Asp
7	70	M	Direito	IV	Bem	12	Gly12Val
5	65	M	Direito	IV	Bem	13	Gly13Asp
3	63	F	Direito	IIIC	Moderado	12	Gly12Glu
48	56	F	Direito	IIA	Moderado	13	Gly13Asp
21	57	F	Esquerdo	I	Bem	12	Gly12Val
Mutação <i>BRAF</i>							
17	73	M	Direito	IV	Bem	600	Val600Glu
6	67	M	Direito	IIA	Bem	600	Val600Glu
35	80	M	Esquerdo	IIA	-	600	Val600Glu

Tabela 17 – Associação entre alterações moleculares e características morfológicas do câncer colorretal

	Mutação <i>KRAS</i>		<i>P</i>	Mutação <i>BRAF</i>		<i>p</i>	Status MSI			<i>p</i>
	Selvagem n (%)	Mutados n (%)		Selvagem n (%)	Mutados n (%)		MSS n (%)	MSI-L n (%)	MSI-H n (%)	
Localização										
Cólon direito	13 (52,0)	12 (54,5)	0,861	23 (52,3)	2 (66,7)	0,999	19 (47,5)	2 (100,0)	4 (80,0)	0,200
Cólon esquerdo	12 (48,0)	10 (45,5)		21 (47,7)	1 (33,3)		21 (52,5)	0 (0,0)	1 (20,0)	
Estadiamento										
I + II	12 (48,0)	8 (36,4)	0,421	18 (40,9)	2 (66,7)	0,561	17 (42,5)	0 (0,0)	3 (60,0)	0,457
III + IV	13 (52,0)	14 (63,6)		26 (50,1)	1 (33,3)		23 (57,5)	2 (100,0)	2 (40,0)	
Grau de diferenciação										
Bem	8 (33,3)	7 (31,8)	0,610	13 (31,0)	2 (66,7)	0,656	11 (28,2)	1 (50,0)	3 (60,0)	0,217
Moderado	15 (62,5)	12 (54,5)		25 (59,5)	1 (33,3)		25 (64,1)	1 (50,0)	1 (20,0)	
Pouco	1 (4,2)	3 (13,6)		4 (9,5)	0 (0,0)		3 (7,7)	0 (0,0)	1 (20,0)	
Tratamento neoadjuvante										
Não	21 (84,0)	18 (81,8)	0,999	37 (84,1)	2 (66,7)	0,444	34 (85,0)	0 (0,0)	5 (100,0)	0,034
Sim	4 (16,0)	4 (18,2)		7 (15,9)	1 (33,3)		6 (15,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	

Mutação *KRAS* foi detectada em 14 (13,6%) e 22 (46,8%) lesões precursoras e adenocarcinomas colorretais, respectivamente, enquanto *KRAS* selvagem foi observado em 89 (86,4%) lesões precursoras e 25 (53,2%) cânceres colorretais ($p < 0,001$). Os mesmos tipos de mutações *KRAS* encontradas nas lesões precursoras foram também observados nos cânceres colorretais, com exceção de duas mutações [Gly12Glu (5,5%) e Gly12Cys (5,5%)], que foram detectadas apenas entre os cânceres colorretais.

Mutação *BRAF* foi encontrada em 9 (8,7%) lesões precursoras e 3 (6,5%) cânceres colorretais, e *BRAF* selvagem foi observado em 94 (91,3%) e 43 (93,5%) lesões precursoras e adenocarcinomas colorretais, respectivamente ($p = 0,755$).

Dentre as 64 lesões precursoras localizadas no cólon esquerdo, 12 (18,8%) tiveram mutação *KRAS*. No grupo de pacientes com câncer colorretal, 10 (45,5%) dos 22 pacientes com neoplasia no cólon esquerdo demonstraram ter mutação *KRAS* ($p < 0,013$; Tabela 18). Em contrapartida, apenas 2 (5,1%) das 39 lesões precursoras localizadas no cólon direito desenvolveram tal mutação, e entre os 25 cânceres colorretais do cólon direito, encontramos 12 (48,0%) *KRAS* mutado ($p < 0,001$; Tabela 18).

Em relação ao *status* de *BRAF* não foi encontrada diferença entre as lesões precursoras e câncer colorretal quando considera a variável de localização (Tabela 18).

Tabela 18 – Associação entre as frequências de mutação *KRAS* e *BRAF* nas lesões precursoras e nos cânceres colorretais de acordo com a localização

Gene	Cólon direito		P	Cólon esquerdo		P
	Lesões precursoras	Câncer colorretal		Lesões precursoras	Câncer colorretal	
<i>KRAS</i>						
Mutado	2 (5,1)	12 (48,0)	0,001	12 (18,8)	10 (45,5)	0,013
Selvagem	37 (94,9)	13 (52,0)		52 (81,2)	12 (54,5)	
<i>BRAF</i>						
Mutado	4 (10,3)	2 (8,3)	0,999	5 (7,8)	1 (4,5)	0,999
Selvagem	35 (89,7)	22 (91,7)		59 (92,2)	21 (95,5)	

6. DISCUSSÃO

As alterações moleculares presentes nas lesões precursoras do câncer colorretal na população brasileira são praticamente desconhecidas. Este estudo procurou contribuir para a caracterização morfológica e molecular das diferentes lesões precursoras do câncer colorretal através das análises em uma população brasileira referida ao departamento de endoscopia do Hospital de Câncer de Barretos para realização de colonoscopia. É importante ressaltar, que em virtude do caráter especializado deste Departamento, os pacientes incluídos no estudo eram em grande parte de risco aumentado para o desenvolvimento de câncer colorretal, onde a prevalência de lesões precursoras tende a ser maior, tendo em vista que as principais indicações foram vigilância pós-colectomia por câncer colorretal, seguimento pós polipectomia e neoplasia colorretal.

Inicialmente, todas as lesões precursoras foram caracterizadas quanto ao tipo histológico e características endoscópicas. Esta caracterização foi seguida pelas análises mutacionais dos oncogenes *KRAS* e *BRAF* e análise de MSI em uma parte destas lesões procurando incluir um número semelhante dos dois principais grupos de lesões precursoras: adenomas e pólipos serrilhados. Além das descrições de frequências, neste trabalho, analisamos as associações entre as características endoscópicas e moleculares dos grupos histológicos com a expectativa de entender a carcinogênese colorretal e abrir novas possibilidades futuras de inclusão da detecção molecular nas estratégias do rastreamento e detecção precoce do câncer colorretal.

6.1. Características endoscópicas e histológicas das lesões precursoras do câncer colorretal

Este estudo demonstrou, em uma série de 342 lesões, que os adenomas corresponderam à maioria das lesões precursoras do câncer colorretal com frequências similares às relatadas previamente por outros autores (51 a 67%) em diferentes estudos em outras populações¹⁵⁻¹⁸. Também como demonstrado na literatura, os adenomas tubulares foram mais frequentes do que os vilosos e túbulo vilosos¹⁸.

Diferentemente dos adenomas, a interpretação dos resultados referentes aos pólipos serrilhados é prejudicada pela classificação não homogênea dos mesmos entre os estudos, principalmente aqueles anteriores à classificação da OMS em 2010, e a escassez de estudos devido à raridade dos adenomas serrilhados. Apesar disto, as frequências encontradas na

nossa população foram próximas àsquelas dos estudos previamente publicados, 82,4% de pólipos hiperplásicos, 12,7% de adenomas serrilhados sésseis, 2,0% de adenomas serrilhados tradicionais e 2,9% de pólipos mistos^{15, 18, 36, 37}. Diversos estudos prévios demonstram que os pólipos hiperplásicos são as lesões mais frequentes entre os pólipos serrilhados (80 a 90%), seguidos pelos adenomas serrilhados sésseis (15 a 25%)^{6, 18, 32}, adenomas serrilhados tradicionais (<1%) e pólipos que contém mais de um componente histopatológico, outramente denominados pólipos mistos (0,7 a 4,7%)^{15, 18, 36, 37}.

Além do conhecimento da frequência de cada tipo histológico no universo das lesões precursoras, também é importante definir as características endoscópicas destas lesões, visto que lesões de diferentes morfologia, tamanho e localização parecem ter comportamentos biológicos distintos. Endoscopicamente, as lesões podem ser polipóides e não polipóides (plano-deprimidas). Caracteristicamente, as lesões não polipóides, são aquelas de maior dificuldade de se detectar durante a colonoscopia e podem não ser detectadas e conseqüentemente não ressecadas^{18, 23}. Isto pode ser problemático, visto que os adenomas não polipóides são considerados como tendo mais frequentemente displasia de alto grau do que os adenomas polipóides¹⁰. Saitoh et al realizaram um estudo na população americana onde foram incluídos 211 pacientes. Dentre as lesões precursoras, 72,3% eram adenomas e o restante eram pólipos hiperplásicos. Entretanto, os autores demonstraram que as lesões não polipóides tinham câncer invasivo com maior frequência do que as lesões polipóides (4,5% vs 0% ; $p= 0,04$), pois 3 lesões precursoras não polipóides tiveram câncer invasivo enquanto nenhuma lesão polipóide desenvolveu neoplasia⁸³.

A prevalência destas lesões nas diferentes populações depende de vários fatores, tais como: disponibilidade de realização de colonoscopia; expertise do endoscopista; disponibilidade de endoscópios de alta resolução; uso da cromoendoscopia; e do diagnóstico histopatológico. Em colonoscopias realizadas por endoscopistas treinados, a prevalência varia entre 12 e 40%¹⁰. Saitoh et al relataram, em uma série de 188 lesões precursoras que 122 (64,9%) foram polipóides e 66 (35,1%) foram classificadas como não polipóides⁸³. Com endoscopistas treinados, utilizando colonoscópios de alta resolução e cromoscopia, o presente estudo demonstrou em uma série de 342 lesões, uma frequência de 12,6% de lesões não polipóides. Apesar de estar no limite inferior, esta frequência está dentro do intervalo no qual estas lesões são detectadas.

A grande maioria das lesões, tanto adenomas quanto os serrilhados, foi classificada como lesões polipóides. Interessantemente, quando estratificados em hiperplásicos e adenomas serrilhados, acreditando que os hiperplásicos apresentam um comportamento mais benigno do que os adenomas serrilhados, os últimos tiveram uma maior frequência de lesões não polipóides quando comparados com os adenomas e os pólipos hiperplásicos. Em um período de dois anos, Tadepalli et al realizaram 1672 colonoscopias, sendo que destas, 178 (10,6%) pacientes tiveram adenomas serrilhados sésseis. No entanto, apenas 124 pacientes continham todos os dados, o que correspondia a 158 lesões. Os autores reportaram nesta série de 158 adenomas serrilhados sésseis que apenas 1,9% foram polipóides, enquanto dos outros 155 restantes (98,1%), 96% foram levemente elevados e 4% foram totalmente planas³⁶.

6.2. Alterações moleculares nas lesões precursoras do câncer colorretal

O potencial maligno das lesões serrilhadas foi primeiramente cogitado na descrição da síndrome da polipose hiperplásica⁸⁴. A polipose hiperplásica é descrita por alguns autores como uma síndrome de predisposição ao câncer colorretal rara, caracterizada pela presença de 30 ou mais pólipos hiperplásicos independente do tamanho distribuídos através do cólon ou pela presença de alguns pólipos hiperplásicos maiores do que 10mm de diâmetro ou ainda qualquer número de pólipos hiperplásicos em pacientes cujo um parente de primeiro grau tenha polipose hiperplásica^{85, 86}. Alguns destes pólipos foram classificados como mistos por terem características de adenomas, e alguns deles demonstravam características, tanto de arquitetura quanto citológicas, de pólipos hiperplásicos e adenomas, sendo caracterizada pelas criptas serrilhadas, presença de imaturidade das células caliciformes, de mitoses na zona superior e nucléolo proeminente⁸⁷. Longacre e Fenoglio-Preiser descreveram que tais pólipos eram uma variável dos adenomas, e sugeriram o termo adenoma serrilhado⁸⁷.

Os pólipos hiperplásicos ainda continuam sendo clinicamente considerados como lesões “benignas”. Muitos endoscopistas assumem que, lesões que tem aspecto de pólipo hiperplásico, pelo teórico caráter benigno destas lesões, não precisam ser ressecadas. O pólipo hiperplásico não requer vigilância, mas em contrapartida, os adenomas serrilhados sésseis são submetidos à mesma vigilância do que os pacientes portadores de adenomas⁸⁸.

Para tentar entender um pouco mais dos potenciais malignos destas lesões, o próximo passo deste estudo foi analisar alterações genéticas normalmente envolvidas na carcinogênese colorretal. Visto que a análise molecular não seria possível nesta fase ser realizada nas 342 lesões incluídas, baseado em cálculo amostral, foram selecionadas 103 lesões com uma distribuição entre os dois grandes grupos histológicos de 50 adenomas e 53 pólipos serrilhados. Para chegar ao número 103 sem que os testes perdessem poder estatístico, o tamanho amostral foi calculado baseado nos principais estudos de lesões precursoras e aqueles que incluíssem as lesões serrilhadas ^{15, 18, 42}. Tendo em vista a divergência existente entre os estudos utilizados, e tentando abranger todos os estudos citados, definimos finalmente um tamanho amostral de 103 lesões precursoras, uma de cada paciente, sendo 50 adenomas e 53 pólipos serrilhados. Embora este número de pacientes aparentemente é pequeno, de acordo com o cálculo do tamanho amostral, seria suficiente para avaliarmos as frequências de mutações *KRAS* e *BRAF* entre as lesões precursoras do câncer colorretal, principalmente pelo número pequeno de pólipos serrilhados em outros estudos.

Diferentemente do câncer colorretal, as frequências de mutações *KRAS* e *BRAF* descritas até o momento nas lesões precursoras ainda apresentam uma grande variabilidade, principalmente as descritas para os pólipos serrilhados. De acordo com estudos anteriores, mutação *KRAS* foi encontrada entre 7,3 a 9,3% dos adenomas convencionais ^{18, 42}, 9 a 73% dos pólipos hiperplásicos, 7 a 25% dos adenomas serrilhados sésseis ^{18, 20, 28, 42, 51, 53, 54} e em 0 a 28% dos adenomas serrilhados tradicionais ^{18, 42}. A análise de mutações *KRAS* e *BRAF* neste estudo demonstrou que mutações *KRAS* foram encontradas apenas em adenomas e pólipos hiperplásicos enquanto mutações *BRAF* foram observadas apenas nos pólipos serrilhados, sendo específica neste grupo de lesões precursoras. Até o momento, a maioria dos estudos que analisaram *KRAS* em adenomas serrilhados mostra que a incidência desta mutação é menor do que mutação em *BRAF*, entretanto, a variação da frequência de mutação ainda não é clara. Spring et al relataram que mutação *KRAS* foi encontrada em aproximadamente 8,0% dentre os 39 adenomas serrilhados ¹⁸. Yang et al, ao analisarem uma série de 79 pólipos hiperplásicos e 25 adenomas serrilhados relataram que mutação em *KRAS* foi encontrada em 16,5% e 28,0% dos pólipos hiperplásicos e adenomas serrilhados, respectivamente ⁵³. A ausência de mutação *KRAS* nos adenomas serrilhados deste estudo pode ser justificada pelo tamanho reduzido de amostra, por diferenças na

metodologia, mas pode também ser característica da população analisada. A ausência de mutação no presente estudo pode ser um indicativo de que na população analisada, a via do serrilhado é ativada através de mutação no oncogene *BRAF*.

Pólipos hiperplásicos com mutação *KRAS* foram mais frequentes no cólon esquerdo, corroborando com dados publicados por Spring et al ¹⁸. Mutações *KRAS* foram fortemente associadas aos adenomas avançados assim como no estudo de Yadamsuren et al, que relataram uma frequência de 57,5% de mutação *KRAS* entre os adenomas avançados e 31,0% entre os adenomas não avançados em uma série de 164 adenomas polipóides esporádicos ²⁴, demonstrando que os adenomas avançados têm maior frequência de mutação *KRAS*, que aumenta o risco de progressão tumoral por estar envolvida no estágio intermediário da evolução adenoma-adenocarcinoma ²⁴.

Mutação *BRAF* foi associada a pólipos serrilhados, sendo distribuídas entre o cólon direito e esquerdo, embora entre os pólipos hiperplásicos tal mutação tenha sido encontrada apenas no cólon direito. Spring et al também relataram que mutação *BRAF* foi encontrada tanto no cólon direito quanto no esquerdo, mas mutação *BRAF* nos pólipos hiperplásicos, foi predominante no cólon esquerdo ¹⁸. O fato de todas as mutações *BRAF* nos pólipos hiperplásicos terem sido detectadas no cólon direito pode ser justificada pelo reduzido número de lesões analisadas.

A importância dos pólipos hiperplásicos na carcinogênese colorretal necessita de ser melhor explorada. Os pólipos hiperplásicos eram reconhecidos como lesões sem potencial de malignidade, entretanto, Torlakovic e Snover relataram que alguns pacientes com polipose hiperplásica também tinham carcinoma ou adenoma colorretal, e isto levantou rumores com relação ao potencial pré-maligno dos pólipos hiperplásicos ³⁵. Neste contexto, o significado das mutações no pólipo hiperplásico pode ter um impacto no curso da doença, no entanto este fato não é claro.

Estudos demonstram que as lesões precursoras do câncer colorretal raramente demonstram altos níveis de MSI, sendo encontrado entre 0,0 a 8,0% das lesões precursoras do câncer colorretal na maioria dos estudos ^{20, 28, 42, 51, 54}. Contudo, Konishi et al relataram que MSI-H foi observado em 36% dos adenomas serrilhados sésseis. No presente estudo nenhuma lesão precursora foi classificada como MSI-H similar ao descrito na maioria dos estudos da literatura, porém, diferente da frequência relatada por Konishi et al ao analisar uma série de 47 adenomas serrilhados coletados da população japonesa ²⁰. De diferente o

nosso estudo incluiu 15 adenomas serrilhados podendo este tamanho amostral justificar os resultados tão diferentes pela população. Em relação ao método empregado para análise de MSI, neste presente estudo foi utilizada uma PCR pentaplex para amplificar cinco marcadores mononucleotídeos. que segundo Goel et al, teria maior especificidade e sensibilidade para análise de MSI do que o que foi usado por Konishi et al.. A análise de um maior numero de adenomas serrilhados na população Brasileira poderia melhor esclarecer estes achados e, se confirmado, a ausência de MSI em lesões precursoras pode ser um indicativo de que MSI é um evento tardio na evolução para adenocarcinoma.

6.3 Relação entre as lesões precursoras do câncer colorretal e os adenocarcinomas colorretais

As frequências de mutação dos oncogenes *KRAS* e *BRAF* encontrados no nosso estudo são similares às descritas na literatura internacional. A mutação *KRAS* está presente em 30 a 40% dos cânceres colorretais esporádicos^{6, 43-45, 89} e a mutação *BRAF*, 0 – 15,6% entre os mesmos^{45, 55, 89, 90}.

Santini et al demonstraram em uma série de 99 pacientes, incluídos na Itália com câncer colorretal metastático, que a mutação *KRAS* foi detectada em 38 (38,4%) dos cânceres primários⁴³. Um estudo realizado na Suíça reportou que dentre os 1420 cânceres colorretais esporádicos coletados entre 1987 a 1996, 392 foram submetidos à análise de mutação *KRAS* e 374 foram analisados com relação à mutação *BRAF*. Destes, 30,1% e 12,0% tiveram mutação *KRAS* e *BRAF*, respectivamente. Stefanius et al relataram que entre os 32 cânceres incluídos na Finlândia, 25,4% tiveram mutação *KRAS* e nenhum teve mutação *BRAF*, sendo que tais frequências sugerem que mutação *BRAF* é específica entre os pólipos e adenocarcinomas serrilhados⁴⁵.

Nosso grupo encontrou 10,5% de MSI-H entre os cânceres colorretais inferior ao valor de 15% geralmente descrito em outras populações possivelmente relacionado às diferenças étnicas⁸.

Ao comparar as alterações moleculares das lesões precursoras e do câncer colorretal, observamos que mutações *KRAS* nas lesões precursoras foram predominantes no cólon esquerdo, enquanto estas mutações nos adenocarcinomas foram distribuídas entre ambos os segmentos direito e esquerdo do cólon. Embora não tenha sido estatisticamente significativo, as mutações *KRAS* nos pólipos hiperplásicos predominaram no cólon esquerdo.

Tais resultados nos levam a especular que pólipos hiperplásicos do cólon esquerdo possivelmente têm menor importância clínica, pois provavelmente não evoluem para neoplasia. Em contrapartida, não se sabe o significado das alterações moleculares nos pólipos hiperplásicos do cólon direito, mas os achados deste estudo sugerem que lesões precursoras com mutação *BRAF* localizadas no cólon direito podem progredir para adenocarcinoma. Isto vai de encontro com os relatos de que os pólipos hiperplásicos do cólon esquerdo não apresentam qualquer potencial maligno para câncer colorretal esporádico e que o câncer de origem serrilhada está mais localizado no cólon direito do que no esquerdo ⁹¹. Qual o significado mutação nos pólipos hiperplásicos do cólon esquerdo e porque eles não evoluiriam para outras lesões serrilhadas ainda é alvo de estudo. Pela indefinição do caráter maligno, atualmente os pólipos hiperplásicos não são submetidos à vigilância endoscópica e com o avanço da endoscopia que permite a melhor caracterização das lesões precursoras, muitas vezes as lesões sugestivas de pólipos hiperplásicos, principalmente do cólon esquerdo, não são ressecados. Embora estudos tenham sugerido que uma pequena porcentagem de pólipos hiperplásicos pode evoluir para câncer colorretal, ainda não foi elucidado quais são. Provavelmente, dentre os pólipos hiperplásicos com potencial de malignidade, estão aqueles maiores do que 10mm, localizados no cólon direito, pólipos hiperplásicos com foco de adenoma, mais de 20 pólipos hiperplásicos no cólon, histórico familiar de polipose hiperplásica e história familiar de câncer colorretal ⁹².

Como já esperado e de acordo com os relatos na literatura em outras populações, mutação em *BRAF* foi encontrada apenas entre os pólipos serrilhados e com frequências comparáveis ao câncer colorretal.

É importante ressaltar que, as mutações presentes nas lesões precursoras são as mesmas daquelas encontradas nos adenocarcinomas, sugerindo que estas mutações sejam patogênicas.

6.4. Direções futuras

No contexto atual, epidemiológico e de prognóstico do câncer colorretal no mundo e no Brasil, é extremamente importante aumentar o conhecimento da carcinogênese colorretal e paralelamente melhorar as estratégias de detecção e remoção de lesões precursoras do câncer colorretal com objetivo de redução da incidência e mortalidade.

Estudos futuros incluindo um maior número de lesões ainda são necessários para melhor esclarecer os resultados encontrados neste estudo. Ainda, os oncogenes *KRAS* e *BRAF* são importantes, no entanto não são os únicos eventos que ocorrem na carcinogênese colorretal. Portanto para melhor compreensão, de forma detalhada as lesões serrilhadas e definir aquelas com maior potencial de malignidade, novos estudos envolvendo outros marcadores moleculares são fundamentais para a compreensão das vias envolvidas nesta neoplasia, pois desta maneira poderemos comparar as alterações encontradas no câncer colorretal com as encontradas nas lesões precursoras e tentar correlacionar com uma futura inclusão da detecção molecular nas estratégias de detecção precoce e rastreamento do câncer colorretal (25).

7. CONCLUSÕES

Este estudo atingiu os objetivos inicialmente propostos, e conclui-se que:

1. Mutações *KRAS* e *BRAF* foram detectadas em 14 (13,6%) e 9 (8,7%) das 103 lesões precursoras, respectivamente.
2. O fenótipo MSI-H foi detectado apenas entre os cânceres colorretais;
3. Mutação *KRAS* foi detectada apenas entre adenomas e pólipos hiperplásicos, sendo mais frequentes no cólon esquerdo. Com relação a morfologia, a maioria foi polipóide e todas as lesões foram menores do que 10mm. Em contrapartida, mutação *BRAF* foi específica entre os pólipos serrilhados, sendo significativamente associada aos adenomas serrilhados. Tais mutações foram divididas entre os cólons direito e esquerdo, foram predominantemente polipóides e menores do que 10mm.
4. Entre os adenocarcinomas colorretais, mutações *KRAS* foram mais frequentes do que mutação *BRAF*. Além do mais, não foram observadas associações entre as alterações moleculares e as características morfológicas do câncer colorretal.

8. REFERÊNCIAS

1. Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. *Global cancer statistics*. **CA Cancer J Clin**. 2011;61(2):69-90.
2. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. *Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008*. **Int J Cancer**. 2010;127(12):2893-917.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Coordenação Geral de Ações Estratégicas. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2012 : incidência de câncer no Brasil*. **Rio de Janeiro: INCA**; 2011. 118 p.
4. Fearon ER. *Molecular genetics of colorectal cancer*. **Annu Rev Pathol**. 2011;6:479-507.
5. Pollock R. E.; Doroshow J. H.; Khayat D.; Nakao A.; O'Sullivan B. *Manual de Oncologia Clínica da União Internacional Contra o Câncer*. **São Paulo: Wiley**; 2008. 919 p.
6. Bosman FT; World Health Organization; International Agency for Research on Cancer. *World Health Organization classification of tumours of the digestive system*. 4th edn ed. edn t, editor. **Lyon, France**, 2010. 417 p.
7. Centelles JJ. *General aspects of colorectal cancer*. **ISRN Oncol**. 2012;2012:139268.
8. Vilar E, Gruber SB. *Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2010;7(3):153-62.
9. Laghi L, Malesci A. *Microsatellite instability and therapeutic consequences in colorectal cancer*. **Dig Dis**. 2012;30(3):304-9.
10. Lambert R, Provenzale D, Ectors N, Vainio H, Dixon MF, Atkin W, et al. *Early diagnosis and prevention of sporadic colorectal cancer*. **Endoscopy**. 2001;33(12):1042-64.
11. Waun Ki Hong RCBJ, William N. Hait, Donald W. Kufe, Raphael E. Pollock, Ralph R. Weichselbaum, James F. Holland, Emil Frei III. *Cancer Medicine*. **Shelton, Connecticut: American Association for Cancer Research**; 2010.
12. Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. **Cell**. 1990;61(5):759-67.
13. Lieberman DA, Weiss DG, Bond JH, Ahnen DJ, Garewal H, Chejfec G. *Use of colonoscopy to screen asymptomatic adults for colorectal cancer. Veterans Affairs Cooperative Study Group 380*. **N Engl J Med**. 2000;343(3):162-8.

14. Rex DK, Cutler CS, Lemmel GT, Rahmani EY, Clark DW, Helper DJ, et al. *Colonoscopic miss rates of adenomas determined by back-to-back colonoscopies.* **Gastroenterology.** 1997;112(1):24-8.
15. Carr NJ, Mahajan H, Tan KL, Hawkins NJ, Ward RL. *Serrated and non-serrated polyps of the colorectum: their prevalence in an unselected case series and correlation of BRAF mutation analysis with the diagnosis of sessile serrated adenoma.* **J Clin Pathol.** 2009;62(6):516-8.
16. Bariol C, Hawkins NJ, Turner JJ, Meagher AP, Williams DB, Ward RL. *Histopathological and clinical evaluation of serrated adenomas of the colon and rectum.* **Mod Pathol.** 2003;16(5):417-23.
17. Kahi CJ, Hewett DG, Norton DL, Eckert GJ, Rex DK. *Prevalence and variable detection of proximal colon serrated polyps during screening colonoscopy.* **Clin Gastroenterol Hepatol.** 2011;9(1):42-6.
18. Spring KJ, Zhao ZZ, Karamatic R, Walsh MD, Whitehall VL, Pike T, et al. *High prevalence of sessile serrated adenomas with BRAF mutations: a prospective study of patients undergoing colonoscopy.* **Gastroenterology.** 2006;131(5):1400-7.
19. Brenner H, Chang-Claude J, Rickert A, Seiler CM, Hoffmeister M. *Risk of colorectal cancer after detection and removal of adenomas at colonoscopy: population-based case-control study.* **J Clin Oncol.** 2012;30(24):2969-76.
20. Konishi K, Yamochi T, Makino R, Kaneko K, Yamamoto T, Nozawa H, et al. *Molecular differences between sporadic serrated and conventional colorectal adenomas.* **Clin Cancer Res.** 2004;10(9):3082-90.
21. Sillars-Hardebol AH, Carvalho B, de Wit M, Postma C, Delis-van Diemen PM, Mongera S, et al. *Identification of key genes for carcinogenic pathways associated with colorectal adenoma-to-carcinoma progression.* **Tumour Biol.** 2010;31(2):89-96.
22. *The Paris endoscopic classification of superficial neoplastic lesions: esophagus, stomach, and colon: November 30 to December 1, 2002.* **Gastrointest Endosc.** 2003;58(6 Suppl):S3-43.
23. Kudo S, Lambert R, Allen JI, Fujii H, Fujii T, Kashida H, et al. *Nonpolypoid neoplastic lesions of the colorectal mucosa.* **Gastrointest Endosc.** 2008;68(4 Suppl):S3-47.
24. Yadamsuren EA, Nagy S, Pajor L, Lacza A, Bogner B. *Characteristics of advanced- and non advanced sporadic polypoid colorectal adenomas: correlation to KRAS mutations.* **Pathol Oncol Res.** 2012;18(4):1077-84.
25. Makinen MJ. *Colorectal serrated adenocarcinoma.* **Histopathology.** 2007;50(1):131-50.

26. Snover DC. *Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma*. **Hum Pathol**. 2011;42(1):1-10.
27. Groff RJ, Nash R, Ahnen DJ. *Significance of serrated polyps of the colon*. **Curr Gastroenterol Rep**. 2008;10(5):490-8.
28. Kim KM, Lee EJ, Ha S, Kang SY, Jang KT, Park CK, et al. *Molecular features of colorectal hyperplastic polyps and sessile serrated adenoma/polyps from Korea*. **Am J Surg Pathol**. 2011;35(9):1274-86.
29. Leggett B, Whitehall V. *Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis*. **Gastroenterology**. 2010;138(6):2088-100.
30. Aust DE, Baretton GB, Members of the Working Group GIPotGSoP. *Serrated polyps of the colon and rectum (hyperplastic polyps, sessile serrated adenomas, traditional serrated adenomas, and mixed polyps)-proposal for diagnostic criteria*. **Virchows Arch**. 2010;457(3):291-7.
31. Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. *Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept*. **Am J Clin Pathol**. 2005;124(3):380-91.
32. Bauer VP, Papaconstantinou HT. *Management of serrated adenomas and hyperplastic polyps*. **Clin Colon Rectal Surg**. 2008;21(4):273-9.
33. Vieth M, Quirke P, Lambert R, von Karsa L, Risio M. *Annex to Quirke et al. Quality assurance in pathology in colorectal cancer screening and diagnosis: annotations of colorectal lesions*. **Virchows Arch**. 2011;458(1):21-30.
34. Shimomura T, Hiyama T, Oka S, Tanaka S, Yoshihara M, Shimamoto F, et al. *Frequent somatic mutations of mitochondrial DNA in traditional serrated adenomas but not in sessile serrated adenomas of the colorectum*. **J Gastroenterol Hepatol**. 2011;26(10):1565-9.
35. Torlakovic E, Snover DC. *Serrated adenomatous polyposis in humans*. **Gastroenterology**. 1996;110(3):748-55.
36. Tadepalli US, Feihel D, Miller KM, Itzkowitz SH, Freedman JS, Kornacki S, et al. *A morphologic analysis of sessile serrated polyps observed during routine colonoscopy (with video)*. **Gastrointest Endosc**. 2011;74(6):1360-8.
37. Iino H, Jass JR, Simms LA, Young J, Leggett B, Ajioka Y, et al. *DNA microsatellite instability in hyperplastic polyps, serrated adenomas, and mixed polyps: a mild mutator pathway for colorectal cancer?* **J Clin Pathol**. 1999;52(1):5-9.
38. Pancione M, Remo A, Colantuoni V. *Genetic and epigenetic events generate multiple pathways in colorectal cancer progression*. **Patholog Res Int**. 2012;2012:509348.

39. Voorham QJ, Carvalho B, Spiertz AJ, Claes B, Mongera S, van Grieken NC, et al. *Comprehensive mutation analysis in colorectal flat adenomas*. **PLoS One**. 2012;7(7):e41963.
40. Henderson BR, Fagotto F. *The ins and outs of APC and beta-catenin nuclear transport*. **EMBO Rep**. 2002;3(9):834-9.
41. Sebolt-Leopold JS, Herrera R. *Targeting the mitogen-activated protein kinase cascade to treat cancer*. **Nat Rev Cancer**. 2004;4(12):937-47.
42. Kim YH, Kakar S, Cun L, Deng G, Kim YS. *Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps*. **Int J Cancer**. 2008;123(11):2587-93.
43. Santini D, Loupakis F, Vincenzi B, Floriani I, Stasi I, Canestrari E, et al. *High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice*. **Oncologist**. 2008;13(12):1270-5.
44. Brink M, de Goeij AF, Weijenberg MP, Roemen GM, Lentjes MH, Pachen MM, et al. *K-ras oncogene mutations in sporadic colorectal cancer in The Netherlands Cohort Study*. **Carcinogenesis**. 2003;24(4):703-10.
45. Stefanius K, Ylitalo L, Tuomisto A, Kuivila R, Kantola T, Sirnio P, et al. *Frequent mutations of KRAS in addition to BRAF in colorectal serrated adenocarcinoma*. **Histopathology**. 2011;58(5):679-92.
46. Pino MS, Chung DC. *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. **Gastroenterology**. 2010;138(6):2059-72.
47. Lane DP. *Cancer. p53, guardian of the genome*. **Nature**. 1992;358(6381):15-6.
48. Guimaraes DP, Hainaut P. *TP53: a key gene in human cancer*. **Biochimie**. 2002;84(1):83-93.
49. Leslie A, Carey FA, Pratt NR, Steele RJ. *The colorectal adenoma-carcinoma sequence*. **Br J Surg**. 2002;89(7):845-60.
50. Gurudu SR, Heigh RI, De Petris G, Heigh EG, Leighton JA, Pasha SF, et al. *Sessile serrated adenomas: demographic, endoscopic and pathological characteristics*. **World J Gastroenterol**. 2010;16(27):3402-5.
51. Sandmeier D, Benhattar J, Martin P, Bouzourene H. *Serrated polyps of the large intestine: a molecular study comparing sessile serrated adenomas and hyperplastic polyps*. **Histopathology**. 2009;55(2):206-13.
52. Goldstein NS, Bhanot P, Odish E, Hunter S. *Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas*. **Am J Clin Pathol**. 2003;119(6):778-96.

53. Yang S, Farraye FA, Mack C, Posnik O, O'Brien MJ. *BRAF and KRAS Mutations in hyperplastic polyps and serrated adenomas of the colorectum: relationship to histology and CpG island methylation status.* **Am J Surg Pathol.** 2004;28(11):1452-9.
54. O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, et al. *Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points.* **Am J Surg Pathol.** 2006;30(12):1491-501.
55. Garcia-Solano J, Conesa-Zamora P, Carbonell P, Trujillo-Santos J, Torres-Moreno DD, Pagan-Gomez I, et al. *Colorectal serrated adenocarcinoma shows a different profile of oncogene mutations, MSI status and DNA repair protein expression compared to conventional and sporadic MSI-H carcinomas.* **Int J Cancer.** 2012;131(8):1790-9.
56. Flejou JF. *[WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition].* **Ann Pathol.**31(5 Suppl):S27-31.
57. Jass JR. *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features.* **Histopathology.** 2007;50(1):113-30.
58. Vilar E, Gruber SB. *Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence.* **Nat Rev Clin Oncol.**7(3):153-62.
59. Moran A, Ortega P, de Juan C, Fernandez-Marcelo T, Frias C, Sanchez-Pernaute A, et al. *Differential colorectal carcinogenesis: Molecular basis and clinical relevance.* **World J Gastrointest Oncol.** 2010;2(3):151-8.
60. Flejou JF. *[WHO Classification of digestive tumors: the fourth edition].* **Ann Pathol.** 2011;31(5 Suppl):S27-31.
61. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. *An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers.* **PLoS One.**5(2):e9393.
62. Pino MS, Chung DC. *The chromosomal instability pathway in colon cancer.* **Gastroenterology.**138(6):2059-72.
63. Han Y, Zhou ZY. *Clinical features and molecular alterations of traditional serrated adenoma in sporadic colorectal carcinogenesis.* **J Dig Dis.**12(3):193-8.
64. Schmoll HJ, Van Cutsem E, Stein A, Valentini V, Glimelius B, Haustermans K, et al. *ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making.* **Ann Oncol.**23(10):2479-516.
65. Tuppurainen K, Makinen JM, Junttila O, Liakka A, Kyllonen AP, Tuominen H, et al. *Morphology and microsatellite instability in sporadic serrated and non-serrated colorectal cancer.* **J Pathol.** 2005;207(3):285-94.

66. Sobin L. H. WC. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 6^o edition ed: **John Wiley & Sons, INC., Publication**; 2002.
67. National Cancer Institute. *National Cancer Institute*. [Internet] 2013;Available from: <http://www.cancer.gov>.
68. Winawer SJ, Zauber AG, Fletcher RH, Stillman JS, O'Brien MJ, Levin B, et al. *Guidelines for colonoscopy surveillance after polypectomy: a consensus update by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer and the American Cancer Society*. **Gastroenterology**. 2006;130(6):1872-85.
69. Levin B, Lieberman DA, McFarland B, Smith RA, Brooks D, Andrews KS, et al. *Screening and surveillance for the early detection of colorectal cancer and adenomatous polyps, 2008: a joint guideline from the American Cancer Society, the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer, and the American College of Radiology*. **CA Cancer J Clin**. 2008;58(3):130-60.
70. Baxter NN, Goldwasser MA, Paszat LF, Saskin R, Urbach DR, Rabeneck L. *Association of colonoscopy and death from colorectal cancer*. **Ann Intern Med**. 2009;150(1):1-8.
71. Singh H, Nugent Z, Demers AA, Kliewer EV, Mahmud SM, Bernstein CN. *The reduction in colorectal cancer mortality after colonoscopy varies by site of the cancer*. **Gastroenterology**. 2010;139(4):1128-37.
72. Kudo S, Hirota S, Nakajima T, Hosobe S, Kusaka H, Kobayashi T, et al. *Colorectal tumours and pit pattern*. **J Clin Pathol**. 1994;47(10):880-5.
73. Pohl J, Nguyen-Tat M, Pech O, May A, Rabenstein T, Ell C. *Computed virtual chromoendoscopy for classification of small colorectal lesions: a prospective comparative study*. **Am J Gastroenterol**. 2008;103(3):562-9.
74. Adler A, Pohl H, Papanikolaou IS, Abou-Rebyeh H, Schachschal G, Veltzke-Schlieker W, et al. *A prospective randomised study on narrow-band imaging versus conventional colonoscopy for adenoma detection: does narrow-band imaging induce a learning effect?* **Gut**. 2008;57(1):59-64.
75. Hoffman A, Kagel C, Goetz M, Tresch A, Mudter J, Biesterfeld S, et al. *Recognition and characterization of small colonic neoplasia with high-definition colonoscopy using i-Scan is as precise as chromoendoscopy*. **Dig Liver Dis**. 2010;42(1):45-50.
76. Rex DK, Helbig CC. *High yields of small and flat adenomas with high-definition colonoscopes using either white light or narrow band imaging*. **Gastroenterology**. 2007;133(1):42-7.
77. Rex DK. *Colonoscopic withdrawal technique is associated with adenoma miss rates*. **Gastrointest Endosc**. 2000;51(1):33-6.

78. Imperiale TF, Ransohoff DF. *Understanding differences in the guidelines for colorectal cancer screening*. **Gastroenterology**.138(5):1642-7 e1.
79. Martinho O, Gouveia A, Viana-Pereira M, Silva P, Pimenta A, Reis RM, et al. *Low frequency of MAP kinase pathway alterations in KIT and PDGFRA wild-type GISTs*. **Histopathology**. 2009;55(1):53-62.
80. Valadao M, Braggio D, Santos AF, Pimenta-Inada HK, Linhares E, Goncalves R, et al. *Involvement of signaling molecules in the prediction of response to imatinib treatment in metastatic GIST patients*. **J Surg Res**. 2012.
81. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, et al. *Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation*. **PLoS One**. 2011;6(5):e20588.
82. Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araujo B, Seruca R, Pimentel J, et al. *Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma*. **Neuro Oncol**. 2009;11(5):458-67.
83. Saitoh Y, Waxman I, West AB, Popnikolov NK, Gatalica Z, Watari J, et al. *Prevalence and distinctive biologic features of flat colorectal adenomas in a North American population*. **Gastroenterology**. 2001;120(7):1657-65.
84. Williams GT, Arthur JF, Bussey HJ, Morson BC. *Metaplastic polyps and polyposis of the colorectum*. **Histopathology**. 1980;4(2):155-70.
85. Lambert R, Kudo SE, Vieth M, Allen JI, Fujii H, Fujii T, et al. *Pragmatic classification of superficial neoplastic colorectal lesions*. **Gastrointest Endosc**. 2009;70(6):1182-99.
86. Leggett BA, Devereaux B, Biden K, Searle J, Young J, Jass J. *Hyperplastic polyposis: association with colorectal cancer*. **Am J Surg Pathol**. 2001;25(2):177-84.
87. Longacre TA, Fenoglio-Preiser CM. *Mixed hyperplastic adenomatous polyps/serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia*. **Am J Surg Pathol**. 1990;14(6):524-37.
88. Bettington M, Walker N, Clouston A, Brown I, Leggett B, Whitehall V. *The serrated pathway to colorectal carcinoma: current concepts and challenges*. **Histopathology**. 2013;62(3):367-86.
89. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. *Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis*. **Int J Cancer**. 2010;127(2):367-80.
90. Naguib A, Mitrou PN, Gay LJ, Cooke JC, Luben RN, Ball RY, et al. *Dietary, lifestyle and clinicopathological factors associated with BRAF and K-ras mutations arising in distinct subsets of colorectal cancers in the EPIC Norfolk study*. **BMC Cancer**. 2010;10:99.

91. Noffsinger AE. *Serrated polyps and colorectal cancer: new pathway to malignancy.* **Annu Rev Pathol.** 2009;4:343-64.
92. Jass JR. *Hyperplastic polyps and colorectal cancer: is there a link?* **Clin Gastroenterol Hepatol.** 2004;2(1):1-8.

Anexo A – Comitê de ética em pesquisa



Comitê de Ética em Pesquisa CEP

Para: Denise Peixoto Guimarães

De: Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 05/01/2011

Projeto de Pesquisa: 415/2010

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou em reunião ordinária de 20/12/2010 o projeto de pesquisa 415/2010 “**Caracterização Morfológica e Molecular das Lesões Precursoras do Câncer Colorretal Detectadas por Colonoscopias em Pacientes de Risco**”, decidindo que o mesmo encontra-se:

“Aprovado”

Solicitamos, que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestrais e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
Hospital de Câncer de Barretos

Anexo B – Ficha de coleta de dados

1	Identificação do Paciente	1	
2	Iniciás	2	
3	Registro Hospitalar	3	
4	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino	4	
5	Data de nascimento DD-MM-AAAA	5	
6	Data da colonoscopia DD-MM-AAAA	6	
7	Indicação da colonoscopia 1. Controle pós-operatório; 2. Seguimento pós polipectomia; 3. Neoplasia de cólon (qual segmento?); 4. Outras neoplasias (qual?); 5. Dor abdominal; 6. Sangramento; 7. Diarréia; 8. Assintomático (prevenção); 9. Outras (qual?)	7	
8	Identificação da lesão Anatomia Patológica – número + letra	8	
9	Morfologia da lesão 1. Pólipo séssil; 2. Pólipo subpediculado; 3. Pólipo pediculado; 4. Plano-elevada; 5. Plano-plana; 6. Deprimida; 7. Mista (qual?); 8. LST; 9. Outra (qual?)	9	
10	Tamanho da lesão MM	10	
11	Localização da lesão 1. Ceco; 2. Ascendente; 3. Transverso; 4. Descendente; 5. Sigmóide; 6. Reto; 7. outra (qual)	11	
12	Classificação de Kudo/Paris 1- 0-Is; 2- 0-Ip; 3- 0-Isp; 4- 0-IIa; 5-0-IIb; 6-0-IIc; 7-0-IIa+IIc; 8. 0-IIc+IIa; 9. 0-Is+IIc; 10.LST	12	
13	Cromoscopia convencional com indigo carmin 1- Sim; 2- Não	13	
14	Cromoscopia digital 1- Sim; 2- Não	14	
15	Tipo da cromoscopia digital 1- FICE; 2- NBI; 88- não realizada	15	
16	Magnificação 1- Sim; 2- Não	16	
17	Criptas 1- II; 2- IIIs; 3- IIIL; 4-	17	

	IV; 5- VI; 6- VN ; 7-Não Avaliado		
18	Vascularização 1- Normal; 2- Tênuê; 3- Fina; 4- Densa; 5- Irregular; 6- Esparsa; 7- Tipo I; 8- Tipo II. 9- Tipo III; 10- Tipo IV; 11- Tipo IV; 12- Não Avaliado	18	
19	Anatomia patológica (observador 1) 1- Hiperplásico; 2- Adenoma; 3- Serrilhado; 4- Adenocarcinoma; 5- Outros	19	
20	Anatomia patológica – Se Adenoma 1- Tubular; 2- Túbulo viloso; 88- Não adenoma	20	
21	Anatomia patológica – Se Adenoma, Grau da lesão 1- Baixo grau ; 2- Alto grau 88- Não adenoma	21	
22	Anatomia patológica – Se Serrilhado 1- Séssil; 2- Tradicional; 3- Misto; 88- Não Serrilhado	22	
23	Anatomia patológica (observador 2) 1- Hiperplásico; 2- Adenoma; 3- Serrilhado; 4- Adenocarcinoma; 5- Outros	23	
24	Anatomia patológica – Se Adenoma 1- Tubular; 2- Túbulo viloso; 88- Não adenoma	24	
25	Anatomia patológica – Se Adenoma, Grau da lesão 1- Baixo grau ; 2- Alto grau 88- Não adenoma	25	
26	Anatomia patológica – Se Serrilhado 1- Séssil; 2- Tradicional; 3- Misto; 88- Não Serrilhado	26	
27	Anatomia patológica (observador 3) 1- Hiperplásico; 2- Adenoma; 3- Serrilhado; 4- Adenocarcinoma; 5- Outros	27	
28	Anatomia patológica – Se Adenoma 1- Tubular; 2- Túbulo viloso; 88- Não adenoma	28	
29	Anatomia patológica – Se Adenoma, Grau da lesão 1- Baixo grau ; 2- Alto grau 88- Não adenoma	29	
30	Anatomia patológica – Se Serrilhado 1- Séssil; 2- Tradicional; 3- Misto; 88- Não Serrilhado	30	
31	Mutação KRAS 1- Sim; 2- Não	31	
32	Códon	32	
33	Troca de bases 1- Sim; 2 - Não	33	
34	Troca de aminoácidos 1 - Sim; 2 - Não	34	
35	Nomenclatura	35	

36	Mutação BRAF 1 - Sim; 2 - Não	36	
37	Códon	37	
38	Troca de bases 1 – Sim; 2 - Não	38	
39	Troca de aminoácidos 1- Sim; 2 - Não	39	
40	Nomenclatura	40	