

Gustavo Nóriz Berardinelli

**ELUCIDAÇÃO DO IMPACTO MOLECULAR E CLÍNICO DA
INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL DO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da
Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para
obtenção do título de Doutor em Oncologia

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Barretos, São Paulo
2017

Gustavo Nóriz Berardinelli

**ELUCIDAÇÃO DO IMPACTO MOLECULAR E CLÍNICO DA
INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITE EM PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL DO HOSPITAL DE CÂNCER DE BARRETOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da
Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos para
obtenção do título de Doutor em Oncologia

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis

Barretos, São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

B483e Berardinelli, Gustavo Nóriz.

Elucidação do impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite em pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos / Gustavo Nóriz Berardinelli. - Barretos, SP 2017.

151 f. : il.

Orientador: Dr. Rui Manoel Vieira Reis.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2017.

1. Câncer colorretal. 2. Instabilidade de microssatélites. 3. Diagnóstico molecular. 4. Metilação. 5. Mutação. 6. Sobrevivência. 7. Ancestralidade. I. Autor. II. Reis, Rui Manoel Viera. III. Título.

CDD 616.994

FOLHA DE APROVAÇÃO

Gustavo Nóriz Berardinelli

Elucidação do impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite em pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos

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

Data da aprovação: 15/02/2017

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Beatriz Carvalho
Instituição: Netherlands Cancer Institute

Prof. Dr. Emmanuel Dias Neto
Instituição: AC Camargo Cancer Center

Profa. Dra. Rachel Simões Pimenta Riechelmann
Instituição: Instituto do Câncer do Estado de São Paulo (ICESP)

Prof. Dr. Rui Manuel Vieira Reis
Orientador

Dr. Vinícius de Lima Vazquez
Presidente da Banca

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio parcial do Ministério da Ciência e Tecnologia – FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) através de processo MCT/FINEP/CT-INFRAPROINFRA 02/2010.

As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão do MCT – FINEP.

Esta tese 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.

Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

Dedico este estudo aos meus pais, **Sílvia** e **Geraldo** que sempre me inspiraram e incentivaram na busca de meus sonhos!

Amo vocês!

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes e ao Hospital de Câncer de Barretos, pelos quais, de modo direto e indireto proporcionaram a realização deste estudo. E espero ter contribuído para aliviar a luta que desempenham rotineiramente contra o câncer.

Aos meus pais, Sílvia e Geraldo e a minha irmã Natália, pela companhia, dedicação, paciência e apoio em tudo que desempenho. Sem vocês os meus desafios seriam difíceis. Amo vocês!!

À Cris, por ser essa companhia tão especial na minha vida, que foi chegando de mansinho e hoje me acompanha em todos os momentos. Obrigado pelo carinho, paciência e zelo neste período de desenvolvimento do estudo. Descobri que posso contar com você para tudo! Dorocê!! ;)

Ao Dr Rui Reis, meu orientador e chefe, pelo incentivo e por me presentear com esse projeto desde o início do meu trabalho no Centro de Diagnóstico Molecular. Obrigado pela confiança, ensinamentos e pela oportunidade de crescimento pessoal, científico e profissional.

Ao Dr Cristovam Scapulatempo, pelos ensinamentos, risadas e por tudo que um patologista como o senhor tem para oferecer aos projetos científicos que colabora e desenvolve conosco, contribuindo na nossa formação científica.

Ao Dr Ronílson Durães, pela enorme ajuda na construção do banco de dados clínicos que foi a base para inúmeras análises realizadas por nós neste estudo e em futuros projetos. E pela ajuda nas dúvidas relacionadas a rotina clínica que os pacientes e médicos convivem no dia-a-dia do hospital.

À Banca de Acompanhamento (Dr Vinícius de Lima Vazquez e Dr Emmanuel Dias Neto), pela disponibilidade de analisar este estudo desde o seu início e contribuir enormemente para este resultado.

À Banca de Defesa (Dr Emmanuel Dias Neto, Dra Rachel Simões Pimenta Riechelmann, Dra Beatriz Carvalho e Dr Vinícius de Lima Vazquez), pela disponibilidade de analisar e julgar este estudo contribuindo para a sua finalização e para a minha formação científica.

Ao Dr Rui Pereira, que lá de Portugal, contribuiu sem medir esforços para o desenvolvimento, implantação e análise da ancestralidade genética neste estudo e no nosso grupo de pesquisa.

À Dra Marta Viana, que também lá de Portugal, auxiliou no desenvolvimento e análise dos diversos genes MSI-alvo utilizados neste estudo.

Ao Núcleo de Epidemiologia e Bioestatística (NEB), em especial ao bioestatístico Marco Antônio de Oliveira, pela enorme ajuda no desenvolvimento do estudo, conduzindo todas as análises estatísticas, pelas conversas e trocas de ideias em cada atendimento e ainda, por aceitar o desafio de implantar a análise estatística da ancestralidade genética.

À Dra Denise Guimarães, por todo apoio clínico e científico na elaboração e no desenvolvimento deste estudo.

Aos Departamentos de Digestivo e de Patologia, ao SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística), pelo apoio clínico e técnico na condução deste estudo.

Aos colegas de trabalho do Centro de Diagnóstico Molecular, pelo apoio no desenvolvimento deste projeto, pelas conversas e pelo dia-a-dia que temos no laboratório. E, aos colegas do CPOM, pelo auxílio e colaboração nestes anos de trabalho.

À Pós-graduação, pelo suporte em todas as etapas deste período de desenvolvimento do doutorado. Vocês nos auxiliam demais colaborando com o nosso crescimento científico e profissional.

Aos amigos Lucas, André, Daniel e Raul, por toda a ajuda direta e indireta em tudo que venho desenvolvendo nestes anos de trabalho e pelos diversos momentos de conversa de qualquer assunto pertinente ou não à vida. Valeu!!

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer Colorretal no Mundo e no Brasil	1
1.2	Fatores etiológicos e patogênicos do CCR.....	2
1.3	Evolução Adenoma-Carcinoma do CCR.....	3
1.4	Fatores moleculares do CCR	4
1.5	Instabilidade de Microssatélites no CCR	9
1.6	Instabilidade de Microssatélites no CCR – Síndrome de Lynch	12
1.7	Ancestralidade no câncer	14
1.8	Ancestralidade no Brasil.....	17
2	OBJETIVO.....	19
2.1	Objetivos específicos.....	19
3	MATERIAL E MÉTODOS	20
3.1	Dados demográficos e clínico-patológicos	20
3.2	Obtenção de DNA de indivíduos saudáveis e de pacientes com câncer colorretal	20
3.3	Análise de Instabilidade de Microssatélite (MSI)	21
3.4	Análise de imunoistoquímica das proteínas do MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)	22
3.5	Estudo de potenciais genes MSI-alvo	22
3.6	Análise da metilação da região promotora do gene <i>MLH1</i>	23
3.7	Avaliação da presença de mutação no gene <i>BRAF</i> (V600E)	24
3.8	Determinação da proporção dos componentes da ancestralidade.....	25
3.9	Análise estatística	26
4	RESULTADOS	27
4.1	Dados demográficos e características clínico-patológicas	27
4.2	Padronização da técnica de análise de Instabilidade de Microssatélites (MSI)	30
4.3	Análise de Instabilidade de Microssatélites (MSI).....	33
4.4	Imunoistoquímica das proteínas do <i>Mismatch Repair</i> (MMR)	34
4.5	Comparação entre <i>status</i> de MSI e de imunoistoquímica das proteínas do MMR	36
4.6	Associação do <i>status</i> de MSI com os dados demográficos e clínico-patológicos.....	39
4.7	Mutação em <i>BRAF</i> (V600E) e Metilação de <i>MLH1</i> em casos MSI-H	43
4.8	Estudo de potenciais genes MSI-alvo	46
4.9	Determinação da proporção de ancestralidade	49
4.10	Análise Multivariada para <i>status</i> de MSI	56
4.11	Análises de Sobrevivência Global	59
4.11.1	Análise de sobrevivência global estratificada quanto ao <i>status</i> MSI.....	62
4.12	Análise de Sobrevivência Morte Específica	73
4.13	Análise Multivariada para a sobrevivência por meio de regressão de Cox	76
5	DISCUSSÃO	80
5.1	Dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos	80
5.2	Padronização da técnica de análise de MSI, comparação com a análise imunoistoquímica e análise de MSI em pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos.....	82
5.3	Associação do <i>status</i> de MSI com as características clínico-patológicas dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos.....	86

5.4	Análises de mutação em <i>BRAF</i> (V600E) e de metilação de <i>MLH1</i> em pacientes com CCR e MSI-H do Hospital de Câncer de Barretos	87
5.5	Estudo de potenciais genes MSI-alvo em pacientes com CCR e MSI-H do Hospital de Câncer de Barretos	88
5.6	Proporção de ancestralidades dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos e sua influência sobre <i>status</i> de MSI.....	91
5.7	Características associadas a sobrevivência em pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos	94
6	CONCLUSÃO	98
	REFERÊNCIAS.....	99
	ANEXOS.....	114

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 para ambos os sexos, exceto pele não melanoma.	1
Figura 2 -	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes (ambos os sexos), estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação Brasileira (neoplasia maligna de cólon e reto).	2
Figura 3 -	Vias moleculares envolvidas na patogênese do CCR.	6
Figura 4 -	Atuação das proteínas do <i>Mismatch Repair</i> (MMR).	9
Figura 5 -	Porcentagem do <i>status</i> de MSI para os 1013 casos de câncer colorretal analisados.	33
Figura 6 -	Análise de imunoistoquímica, para todas as proteínas analisadas (MLH1, MHS2, MSH6 e PMS2).	35
Figura 7 -	Eletroferograma de sequência do gene <i>BRAF</i> (éxon 15), em destaque o códon 600.	43
Figura 8 -	Porcentagem do status de mutação do gene <i>BRAF</i> (V600E) para os 106 casos MSI-H avaliados.	44
Figura 9 -	Pirograma da sequência da região promotora do gene <i>MLH1</i> analisada para detecção de metilação.	45
Figura 10 -	Porcentagem do status de metilação da região promotora do gene <i>MLH1</i> para 65 casos MSI-H, que apresentavam perda da expressão da proteína MLH1.	46

Figura 11 -	Análise de genes MSI-alvo. Representação gráfica da análise de fragmento de quatro genes MSI-alvo.	47
Figura 12 -	Porcentagem de casos alterados (expansão ou contração da região de microssatélite analisada) para cada gene MSI-alvo de acordo com a função gênica desempenhada nos casos MSI-H.	49
Figura 13 -	Representação gráfica da estimativa da ancestralidade de cada caso dos grupos analisados (MSS+MSI-L e MSI-H) usando os dados genéticos do painel de diversidade HGDP-CEPH como referências.	50
Figura 14 -	Gráfico de dispersão entre os componentes de ancestralidade, obtido pelo software SPSS.	51
Figura 15 -	Gráfico de dispersão entre os componentes de ancestralidade e os <i>Scores</i> , obtido pelo <i>software</i> SPSS.	54
Figura 16 -	Estimativa da Sobrevivência Global (SG) dos casos de CCR pelo método Kaplan-Meier.	60
Figura 17 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos de CCR quanto ao <i>status</i> MSI pelo método Kaplan-Meier.	60
Figura 18 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto a idade ao diagnóstico pelo método Kaplan-Meier.	63
Figura 19 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier.	64
Figura 20 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao tipo histológico pelo método Kaplan-Meier.	65

Figura 21 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao grau histológico pelo método Kaplan-Meier.	66
Figura 22 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao Tratamento Quimioterapia pelo método Kaplan-Meier.	67
Figura 23 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSI-H quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier.	68
Figura 24 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSI-H quanto ao <i>Score 2</i> pelo método Kaplan-Meier.	69
Figura 25 -	Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L e MSI-H quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier.	72
Figura 26 -	Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR pelo método Kaplan-Meier.	75
Figura 27 -	Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR quanto ao <i>status</i> MSI pelo método Kaplan-Meier.	75
Figura 28 -	Porcentagens do <i>status</i> de MSI-H e de <i>BRAF</i> V600E, para os casos de câncer colorretal analisados, distribuídas pela localização do cólon.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Dados demográficos e características clínico-patológicas dos pacientes portadores de CCR coletados pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) do Hospital de Câncer de Barretos (2014 - 2015).	28
Tabela 2 -	Alelos e o QMVR (<i>Quasimonomorphic Variation Range</i>) para cada marcador.	31
Tabela 3 -	Alelos de todos os marcadores dos indivíduos com alelos fora do QMVR (<i>Quasimonomorphic Variation Range</i>)	32
Tabela 4 -	Número de casos apresentando proteínas do <i>Mismatch Repair</i> com <i>status</i> negativo.	36
Tabela 5 -	Valores para as análises de imunoistoquímica e MSI e análise de concordância (Teste Kappa) entre as duas metodologias.	36
Tabela 6 -	Valores utilizados para análise de Sensibilidade, Especificidade e Acurácia do Teste de Instabilidade de Microssatélite (MSI).	37
Tabela 7 -	Resumo dos casos com dados discordantes entre imunoistoquímica e análise molecular de MSI. Genes MSI-alvo alterados comparados entre DNA de tecido normal e tumoral das amostras.	38
Tabela 8 -	Distribuição do <i>status</i> de MSI-H dentre os dados demográficos e características clínico-patológicas.	40
Tabela 9 -	Porcentagem de casos alterados (expansão ou contração da região de microssatélite analisada) e região gênica do microssatélite para cada gene MSI-alvo analisado nas amostras MSI-H.	48

Tabela 10 -	Valores médios da proporção de ancestralidade para cada grupo analisado.	50
Tabela 11 -	Correlação linear de Pearson entre as ancestralidades.	51
Tabela 12 -	Proporção da variabilidade dos dados explicada por cada componente principal.	52
Tabela 13 -	Coeficientes (autovetores) da matriz de correlação amostral.	52
Tabela 14 -	<i>Scores</i> para cada um dos componentes principais.	53
Tabela 15 -	Coeficiente de correlação de Pearson para as ancestralidades e os <i>Scores</i> analisados.	55
Tabela 16 -	Análise univariada para verificar a relação entre o <i>status</i> MSI e os <i>Scores</i> dos Componentes Principais.	56
Tabela 17 -	Estimativa de Odds Ratio (OR) pelo Modelo de Regressão Logística Múltiplo para <i>status</i> MSI-H.	58
Tabela 18 -	Estimativa da Sobrevivência Global dos casos de CCR e estimativa da Sobrevivência Global estratificada para <i>status</i> MSI, pelo método Kaplan-Meier.	59
Tabela 19 -	Estimativa da Sobrevivência Global (SG) pelo método Kaplan-Meier para cada função gênica dos genes MSI-alvo estratificada pelo <i>status</i> MSI.	62
Tabela 20 -	Estimativa da Sobrevivência Global (SG) pelo método Kaplan-Meier	70

estratificada pelo status MSI.

Tabela 21 -	Estimativa da Sobrevivência Global (SG) pelo método Kaplan-Meier estratificada pelo status MSI com destaque para a variável Estadiamento.	71
Tabela 22 -	Estimativa da Sobrevivência Global dos casos de CCR quanto ao status MSI, tratados com 5-fluorouracil neoadjuvante ou adjuvante, pelo método Kaplan-Meier.	73
Tabela 23 -	Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR e estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) quanto ao status MSI, pelo método Kaplan-Meier.	74
Tabela 24 -	Estimativa do Risco Relativo pelo Modelo de Cox para os tempos de sobrevivência global nas amostras MSS+MSI-L.	78
Tabela 25 -	Estimativa do Risco Relativo pelo Modelo de Cox para os tempos de sobrevivência global nas amostras MSS+MSI-H.	79
Tabela 26 -	Dados demográficos e clínico-patológicos descritos previamente neste presente estudo e nas literaturas internacional e nacional.	81
Tabela 27 -	Dados de frequência de MSI descritos previamente neste presente estudo e nas literaturas internacional e nacional.	85
Quadro 1 -	Critérios para diagnóstico da Síndrome de Lynch considerando história clínica e familiar de câncer.	14

LISTA DE ABREVIATURAS

ABCC5	ATP Binding Cassette Subfamily C Member 5
ACVR1B	Activin A Receptor Type 1B
ACVR2A	Activin A Receptor Type 2A
AFR	Ancestralidade africana
AIMs	Ancestry Informative Markers (Marcadores informativos de ancestralidade)
AME	Ancestralidade ameríndia
APC	Adenomatous Polyposis Coli
ASN	Ancestralidade asiática
ATM	Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangiectasia And Rad3-Related Protein
AXIN	Axin 1
BAX	BCL2 Associated X
BLM	Bloom Syndrome RecQ Like Helicase
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BRCA1	Breast Cancer 1
BRCA2	Breast Cancer 2
CCR	Câncer Colorretal
CIMP	CpG island methylator phenotype (fenótipo metilante)
CIN	Chromosomal Instability (instabilidade cromossômica)
CNV	Copy Number Variation (variação no número de cópia)
CP	Componente Principal
DNA	Deoxyribonucleic Acid (ácido desoxirribonucleico)
DNAPkc	DNA-dependent protein kinase, catalytic subunit
DP	Desvio-padrão
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EUA	Estados Unidos da América
EUR	Ancestralidade Europeia
FAP	Familial Adenomatous Polyposis (Polipose Adenomatosa Familiar)
FBXW7	F-Box And WD Repeat Domain Containing 7
GLYR1	Glyoxylate Reductase 1 Homolog

HNPCC	Hereditary Nonpolypoid Colorectal Cancer (Câncer Colorretal Hereditário Não Polipóide)
HSP110	Heat Shock Protein Family H (Hsp110) Member 1
IC	Intervalo de Confiança
ICG	International Collaborative Group
IGFR2	Fc Fragment Of IgG Receptor IIa
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LOH	Loss of Heterozygosity (Perda de Heterozigosidade)
MAPK	Mitogen Activated Protein Kinases
max	Valor máximo
MBD4	Methyl-CpG Binding Domain 4, DNA Glycosylase
min	Valor mínimo
miRNA	micro RNA
MLH1	MutL Homolog 1
MMR	Mismatch Repair
MRE11	MRE11 Homolog A, Double Strand Break Repair Nuclease
mRNA	RNA mensageiro
MSH2	MutS Homolog 2
MSH3	MutS Homolog 3
MSH6	MutS Homolog 6
MSI	Microsatellite Instability (Instabilidade de Microssatélite)
MSI-H	Microsatellite Instability – High (Alta Instabilidade de Microssatélite)
MSI-L	Microsatellite Instability – Low (Baixa Instabilidade de Microssatélite)
MSS	Microsatellite Stable (Estabilidade de Microssatélite)
NCI	National Cancer Institute
ng	nanograma
NRAS	Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog
OR	Odds Ratio
p53	Tumor Protein P53

pb	pares de base
PCA	Principal Component Analysis (Análise de Componentes Principais)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reação em cadeia da Polimerase)
PD-1	Programmed Cell Death 1
PI3K	Phosphatidylinositol 3 kinase
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase, catalytic subunit alpha
PIK3R1	Phosphoinositide-3-Kinase Regulatory Subunit 1
PMS2	PMS1 Homolog 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
QMVR	Quasi-monomorphic Variation Range (Intervalo de Variação Quasimonórfico)
RAD50	RAD50 Double Strand Break Repair Protein
ROCK1	Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
RR	Risco Relativo
SAME	Serviço de Arquivos Médicos e Estatística
SEER	Surveillance Epidemiology and End Results
SG	Sobrevivência Global
SLC9A9	Solute Carrier Family 9 Member A9
SMAD2	SMAD Family Member 2
SMAD3	SMAD Family Member 3
SMAD4	SMAD Family Member 4
SNP	Single-nucleotide Polymorphisms (Polimorfismos de Nucleotídeo Único)
TCF4	Transcription Factor 4
TCF7L2	Transcription Factor 7 Like 2
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGFB	Transforming Growth Factor Beta
TGFBR1	Transforming Growth Factor Beta Receptor 1
TGFBR2	Transforming Growth Factor Beta Receptor 2
TP53	Tumor Protein P53
TRBP2	Trans-Activation-Responsive RNA-Binding Protein
TSG	Tumor Suppressor Genes (Genes Supressores Tumoriais)
UK NEQAS	United Kingdom National External Quality Assessment Service

WISP3	WNT1 Inducible Signaling Pathway Protein 3
WNT	Wingless-Type MMTV Integration Site Family
XPO5	Exportin 5
XRCC2	X-Ray Repair Cross Complementing 2
μL	microlitro

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
<	Menor
°C	Grau Celsius
μL	Microlitro
≤	Menor ou Igual
χ^2	Qui-quadrado
≥	Maior ou Igual
=	Igual
+	Mais ou Positivo
-	Menos ou Negativo
>	Maior
*	Asterisco
=	Igual

RESUMO

Berardinelli GN. Elucidação do impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite em pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos. **Tese (Doutorado)**. Barretos: Hospital de Câncer de Barretos; 2017.

JUSTIFICATIVA: O câncer colorretal (CCR) é um dos mais incidentes e de maior mortalidade no mundo para ambos os sexos. No Brasil, as suas taxas estão em ascensão, devido ao envelhecimento da população, ao hábito de vida (sedentarismo), a alterações na dieta e a falta de programas de rastreio. Existem três vias genéticas clássicas na patogênese do CCR: instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélite (MSI) e o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP). Estas vias estão correlacionadas e alguns tumores podem apresentar alterações em múltiplas vias. A MSI é a menos frequente, sendo característica dos cânceres hereditários (Síndrome de Lynch ou Câncer colorretal hereditário sem polipose), mas pode também ocorrer em menos de 15% dos tumores esporádicos. Biologicamente, a presença de MSI está associada com um perfil mutacional distinto, que afeta genes MSI-alvo, e consequentemente contribui para um impacto clínico diferente nos pacientes com CCR. Relatos recentes têm sugerido que aspectos inerentes do CCR possam ser influenciados pela etnia dos pacientes. No Brasil, a frequência de MSI e seu impacto biológico e clínico estão pouco explorados e é desconhecida a influência da elevada miscigenação étnica neste contexto. **OBJETIVO:** Elucidar o impacto molecular e clínico da MSI e determinar a ancestralidade genética por meio de marcadores moleculares de pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos. **MATERIAIS E MÉTODOS:** 1013 pacientes foram incluídos no estudo. A técnica de avaliação de MSI foi otimizada para a população brasileira através de um painel de 5 marcadores (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26). As expressões das proteínas de reparo *Mismatch* (MMR): MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, foram avaliadas por imunoistoquímica. Posteriormente, os tumores MSI-H (alta instabilidade de microssatélite) foram analisados para alterações em 24 genes MSI-alvo, para a metilação da região promotora de *MLH1* e para mutações em *BRAF* V600E. A ancestralidade genética foi determinada usando um painel de 46 marcadores AIMs (*Ancestry-Informative Markers*) e os dados clínico-patológicos foram obtidos após consulta de prontuário. **RESULTADOS:** O *status* de MSI foi determinado em todos os casos e observamos que 89,5% não apresentaram MSI, sendo 85,8% MSS (estabilidade de microssatélite) e 3,7% MSI-L (baixa instabilidade de microssatélite), e 10,5% dos casos apresentaram MSI, com fenótipo MSI-H. A correlação do *status* de MSI com as principais

características clínico-patológicas, evidenciou que os casos MSI-H, apresentavam: tumor primário localizado no cólon direito; estadiamento II; metástase classificada em M0; tipo histológico mucinoso; grau histológico III/Indiferenciado; presença de tumor sincrônico; ausência de metástase ao diagnóstico, não recorrência da doença e casos vivos sem doença. Não foi observada diferença estatisticamente significativa na sobrevivência global (SG) entre os casos com diferentes *status* MSI. A análise dos genes MSI-alvo mostrou frequência de alterações distintas, com os genes mais alterados sendo *HSP110*, *ATM* e *EGFR* e nenhuma alteração observada em *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC2*, *PTEN* e *XPO5*. Nos casos MSI-H a frequência de mutação em *BRAF* V600E foi de 26,4% e naqueles que apresentaram perda de expressão de MLH1, a frequência de metilação foi de 72,3%. A proporção média de ancestralidade para os casos foi de 12,6% para africano, 73,9% para europeu, 6,8% para asiático e 6,7% para ameríndio e não houve diferença estatística entre os distintos *status* MSI. **CONCLUSÃO:** A análise de MSI foi devidamente padronizada e implementada no Hospital de Câncer de Barretos. A frequência (10,5%) de casos MSI-H encontrada na população CCR brasileira está dentro do intervalo encontrado em trabalhos internacionais e esses possuem alterações em regiões de microssatélite em genes MSI-alvo, sendo que os mais alterados estão relacionados com funções de reparo de DNA, sensor de dano no DNA, *Heat Shock Proteins* e receptores tirosina-cinase. A metilação da região promotora de *MLH1* foi o principal evento (72%) de inativação deste gene no CCR e a porcentagem (26,4%) de casos MSI-H mutados em *BRAF* V600E é inferior ao reportado internacionalmente. Tal como descrito em outros estudos, o *status* MSI correlacionou-se com várias características clínico-patológicas associadas a tumores menos agressivos, apesar de não termos encontrada diferenças significativas na sobrevida global dos pacientes. Determinamos a proporção média de ancestralidade para os casos com CCR, sendo o componente ancestral europeu o mais representativo (74%), seguido do africano (13%), confirmando estudos de genética populacional. Em análises univariadas, não encontramos relação entre o *status* MSI e a ancestralidade genética do paciente. Concluindo, este estudo constituiu a análise mais profunda e extensa do impacto da MSI na população brasileira de pacientes com CCR.

PALAVRAS-CHAVE: Câncer Colorretal; Instabilidade de Microssatélites; Diagnóstico Molecular; Metilação; Mutação; Sobrevivência; Ancestralidade.

ABSTRACT

Berardinelli GN. Elucidation of the molecular and clinical impact of microsatellite instability on colorectal cancer patients at Barretos Cancer Hospital. **Thesis (PhD's degree)**. Barretos: Barretos Cancer Hospital; 2017.

BACKGROUND: Colorectal cancer (CRC) has a high incidence and mortality in the world for both sexes. In Brazil, the rates have been rising, mostly due to aging, changes in diet and lack of screening programs. There are three classical genetic pathways in CRC pathogenesis: chromosome instability (CIN), microsatellite instability (MSI) and CpG island methylator phenotype (CIMP). They are closely related, and some tumors may harbor alterations in multiple pathways. MSI is the less common pathway, and it is more frequently associated with Lynch Syndrome, but it can also occur in less than 15% of sporadic tumors. Biologically, MSI is associated with a distinct mutational profile, which affects MSI-targeted genes, and consequently contributes to a different clinical impact. Recent reports have suggested that CRC inherent aspects may be influenced by patients' ethnicity. In Brazil, MSI frequency, and its biological and clinical impact are largely unexplored; and the influence of high ethnic miscegenation on this context is unknown. **AIMS:** To elucidate the molecular and clinical impact of MSI and to determine genetic ancestry through CRC patients' molecular markers at Barretos Cancer Hospital. **METHODS:** 1,013 CRC patients were enrolled in the study. The MSI evaluation was optimized for Brazilian population and performed using a multiplex PCR comprising 5 markers (NR27, NR21, NR24, BAT25, and BAT26). Moreover, mismatch repair proteins (MMR) expression MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2, were evaluated by immunohistochemistry. MSI-H tumors were analyzed for alterations in 24 MSI-targeted genes, methylation of MLH1 promoter region and BRAF V600E mutations. Genetic ancestry was evaluated using a 46 AIMs (Ancestry-Informative Markers) panel, and data on clinical and tumor pathological features were obtained from medical records. **RESULTS:** MSS status was observed in 85.9%, MSI-L in 3.7% and MSI-H in 10.5% of the cases. The association of MSI status with the main clinical-pathological features showed that the MSI-H cases presented higher likelihood of primary tumor located in the right colon, stage II, mucinous histological type, grade III/u poorly differentiated histology, presence of synchronic tumor (s) and no recurrence of the disease. There was no statistically significant difference in overall survival (OS) between cases according to MSI status. MSI-targeted genes analyses showed distinct mutation frequencies, with the most frequently mutated genes being *HSP110*, *ATM* and *EGFR*, and no alterations were observed in *BRCA1*, *BRCA2*, *XRCC2*, *PTEN* and *XPO5*. In

MSI-H cases the frequency of BRAF V600E mutation was 26.4% and in those who showed loss of MLH1 expression, the methylation frequency was 72.3%. The average ancestry proportion for all cases was 73.9% of European, 12.6% of African, 6.7% of Native Americans, and 6.8% of East Asian, and no statistical difference was observed between distinct MSI statuses. **CONCLUSION:** The MSI analysis was properly standardized and implemented at Barretos Cancer Hospital. MSI frequency (10.5%) in Brazilian CRC is in agreement with the literature, and we identified altered MSI-targeted genes with potential clinical impact. Methylation was main cause (72%) of *MLH1* alteration and the percentage (26.4%) of mutated MSI-H cases in *BRAF* V600E is lower than reported in the literature. As described in other studies, MSI status was associated with several clinical and pathological features associated with less aggressive tumors, although we did not find significant differences in overall patient survival. We determined the mean ancestry proportion of CRC cases, with the European ancestral component being the most representative (74%), followed by African (13%), confirming population genetic studies. In univariate analyzes, we did not find associations between MSI status and patient genetic ancestry. In conclusion, this study constitutes the most comprehensive analysis of the MSI impact on the CRC Brazilian patients.

KEYWORDS: Colorectal Cancer, Microsatellite Instability, Molecular Diagnostic, Methylation, Mutation, Overall Survival, Ancestry.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer Colorretal no Mundo e no Brasil

O câncer colorretal (CCR) é uma neoplasia comum em países desenvolvidos e menos comum em países em desenvolvimento, como o Brasil. Nos Estados Unidos da América (EUA), estima-se que em 2016 sejam diagnosticados aproximadamente 1,5 milhões de casos para ambos os sexos, sendo a segunda maior causa de mortes relacionadas com câncer, com estimativas de aproximadamente 95 mil novos casos e de aproximadamente 50 mil mortes¹⁻⁴. A taxa de sobrevivência em cinco anos é de cerca de 50%, não apresentando diferenças entre países desenvolvidos (média de 49%) e em desenvolvimento (média de 44%)².

No Brasil as taxas estão em ascensão, provavelmente devido ao envelhecimento da população, aos hábitos de vida, tais como alterações na dieta e a falta de programas de rastreio⁵. Segundo Estimativa 2016⁶ do INCA (Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva – Ministério da Saúde) são esperados, no Brasil, 16.660 novos casos de CCR em homens e 17.620 novos casos em mulheres (Figura 1). Com isso, temos um risco estimado de 16,84 casos novos a cada 100 mil homens e 17,10 a cada 100 mil mulheres.

Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 por sexo, exceto pele não melanoma* (FIGURA 1)

Localização primária	casos novos	%			Localização primária	casos novos	%
Próstata	61.200	28,6%			Mama Feminina	57.960	28,1%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	17.330	8,1%			Cólon e Reto	17.620	8,6%
Cólon e Reto	16.660	7,8%			Colo do Útero	16.340	7,9%
Estômago	12.920	6,0%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.890	5,3%
Cavidade Oral	11.140	5,2%			Estômago	7.600	3,7%
Esôfago	7.950	3,7%			Corpo do Útero	6.950	3,4%
Bexiga	7.200	3,4%			Ovário	6.150	3,0%
Laringe	6.360	3,0%			Glândula Tireoide	5.870	2,9%
Leucemias	5.540	2,6%			Linfoma não Hodgkin	5.030	2,4%
Sistema Nervoso Central	5.440	2,5%			Sistema Nervoso Central	4.830	2,3%

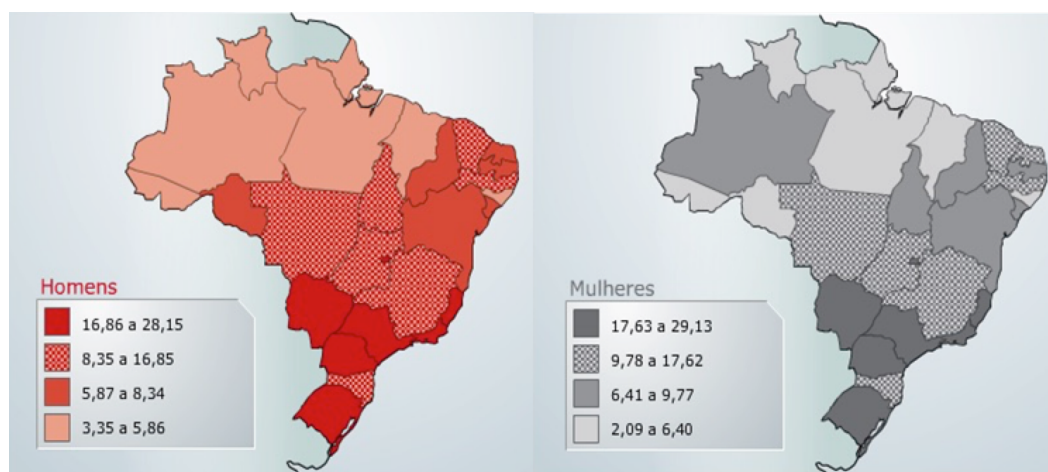
* Números arredondados para múltiplos de 10

Fonte: Adaptado de Estimativa 2016 INCA⁶.

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2016 para ambos os sexos, exceto pele não melanoma. Números arredondados para múltiplos de 10.

Excluindo os tumores de pele não melanoma e analisando pelas regiões brasileiras, o CCR é o segundo mais frequente em homens (24,27/100mil) e mulheres (22,66/100mil) na região Sudeste; o terceiro em homens (14,16/100mil) e mulheres (16,93/100mil) na região

Centro-Oeste; o terceiro para homens (22,35/100mil) e o segundo para mulheres (23,27/100mil) na região Sul; o quarto para homens (5,34/100mil) e o terceiro para mulheres (5,89/100mil) na região Norte e o quarto para homens (7,05/100mil) e o terceiro para mulheres (8,77/100mil) na região Nordeste⁶ (Figura 2).



Fonte: Adaptado de Estimativa 2016 INCA⁶.

Figura 2 - Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil habitantes (ambos os sexos), estimadas para o ano de 2016, segundo Unidade da Federação Brasileira (neoplasia maligna de cólon e reto).

1.2 Fatores etiológicos e patogênicos do CCR

Os fatores etiológicos e os mecanismos patogênicos subjacentes ao desenvolvimento do CCR são complexos e heterogêneos. As lesões que ocorrem na porção proximal (direita) ou distal (esquerda) do cólon exibem diferenças no seu desenvolvimento embrionário, irrigação sanguínea e características clínico-patológicas^{7, 8}. Trabalhos sugerem que a classificação baseada na localização tumoral (CCR lado esquerdo e CCR lado direito) é importante para a compreensão da carcinogênese do CCR⁸⁻¹⁰. Como agentes influenciadores e mecanismos de propensão ao CCR, temos: fatores dietéticos e de estilo de vida, mutações hereditárias e/ou somáticas em importantes genes, hormônios, interações entre a flora intestinal e inflamações^{11, 12}. Dentre os mais significantes fatores dietéticos e de estilo de vida, podemos citar: dieta rica em gorduras insaturadas e carne vermelha, consumo excessivo de álcool e reduzida atividade física. Por outro lado, drogas antiinflamatórias não-esteroidais, estrógeno e cálcio protegem contra o CCR^{11, 12}.

1.3 Evolução Adenoma-Carcinoma do CCR

De modo geral, no trato gastrointestinal, lesões que se projetam da mucosa são comumente denominadas pólipos. A maioria dos pólipos colorretais são pequenas (<5 mm) lesões hiperplásicas que não são tidas como precursoras do CCR, por outro lado, o pólio adenomatoso (adenoma) é provavelmente a mais importante lesão precursora¹³. Os adenomas surgem do epitélio glandular e são caracterizados por morfologia displásica e diferenciação alterada das células epiteliais na lesão. Indícios de carcinoma são frequentemente detectados em pólipos adenomatosos e regiões residuais de epitélio adenomatosos são frequentemente observadas em espécimes de CCR^{13, 14}.

Visto a importância dos adenomas como lesões precursoras do CCR, observa-se risco aumentado em indivíduos onde essas lesões não são removidas e assim, a polipectomia se faz necessária reduzindo o risco de desenvolvimento da doença^{14, 15}. Indivíduos afetados por síndromes que predisõem o surgimento de adenomas, como FAP (*Familial Adenomatous Polyposis*), invariavelmente desenvolvem CCR por volta da terceira ou quarta década de vida caso não realizem um rigoroso controle preventivo ou ainda, permaneçam com o cólon^{13, 14, 16}. No entanto, apenas uma fração dos adenomas evolui para CCR e essa progressão ocorre ao longo de anos ou décadas. Como exemplo, os adenomas de aproximadamente 1 cm de tamanho apresentam uma probabilidade entre 10% a 15% de progressão para o carcinoma ao longo de uma década^{13, 16}. Além disso, pacientes com colite ulcerosa grave e de longa duração têm um aumento de 10 vezes ou mais no risco de CCR em comparação com a população em geral¹⁵.

No modelo de tumorigênese do CCR, descrito por Fearon e Vogelstein¹⁷, a progressão tumoral segue a sequência adenoma-carcinoma, sendo guiada pelo acúmulo progressivo de mutações e tendo o pólio adenomatoso como principal lesão precursora do câncer^{9, 17}. Recentemente, o pólio serrilhado foi reconhecido como uma lesão precursora que segue uma via alternativa e origina o CCR em aproximadamente 10-30% dos casos¹⁸⁻²¹. Os pólipos serrilhados formam um grupo heterogêneo de lesões que incluem: pólio hiperplásico, adenoma serrilhado séssil, adenoma serrilhado tradicional e pólipos mistos (combinação de 2 ou mais características)²². Os pólipos hiperplásicos são os mais comuns e têm sido cada vez mais sugeridos como lesões precursoras, uma vez que podem se desenvolver em outros pólipos serrilhados²³.

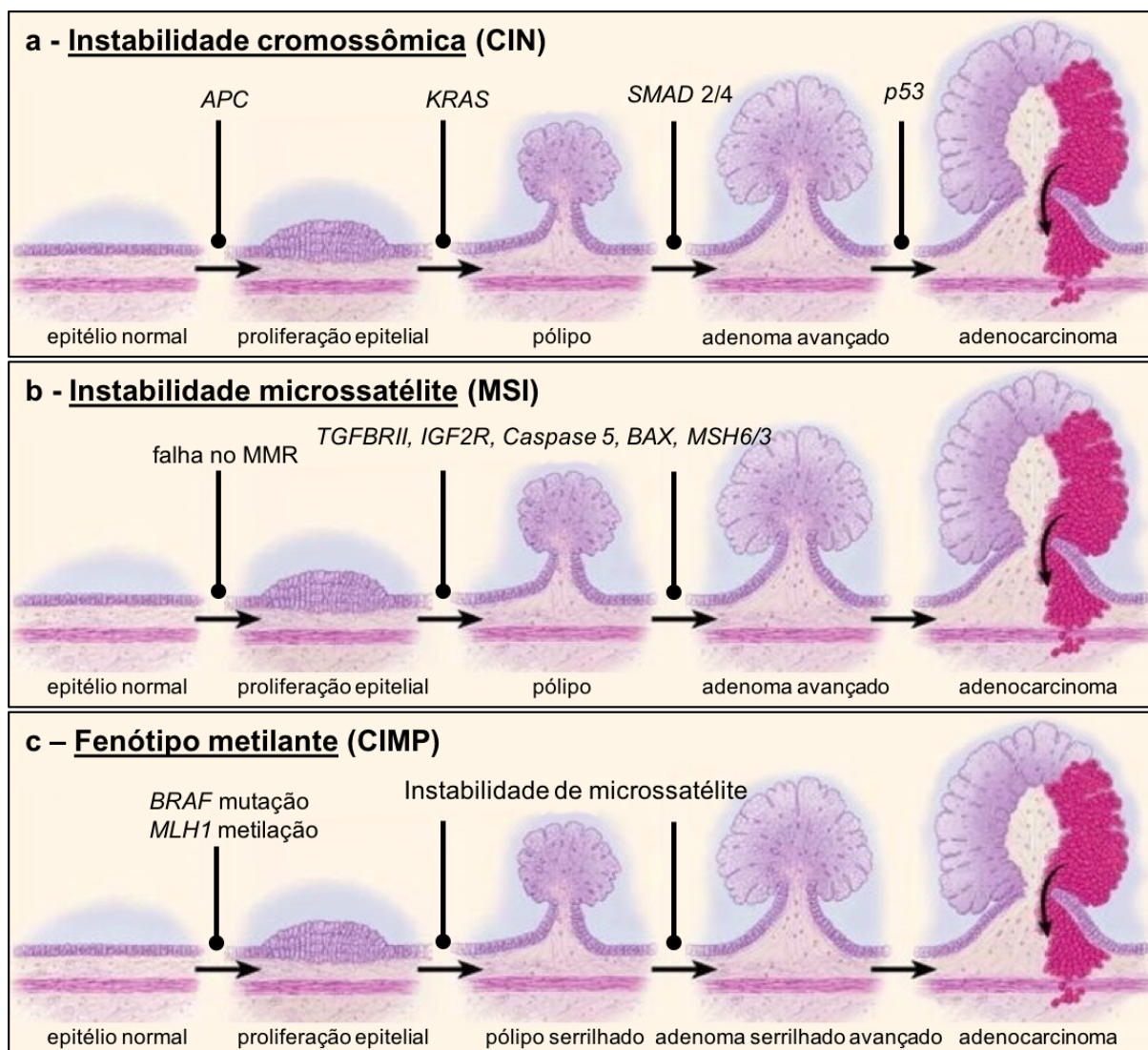
Os mecanismos relacionados ao desenvolvimento do carcinoma serrilhado são pouco compreendidos. Mutações em *BRAF* e menos frequentemente em *KRAS*, são prováveis de serem eventos iniciais no carcinoma serrilhado, e ainda, observa-se presença de instabilidade de microssatélites (MSI) e de metilação (CIMP)^{18, 21}. O'Brien et al²⁴ demonstraram alta frequência (82%) de mutação *BRAF* (V600E) entre carcinomas serrilhados, assim como Yamane et al²² que observaram 40% de mutação *BRAF*, enfatizando que este evento seja um marcador específico na via dos serrilhados. Outra alteração molecular descrita em lesões serrilhadas é a MSI. Stefanius et al²⁵ relataram que 20,6% dos cânceres serrilhados apresentaram MSI, mas raramente observada em lesões serrilhadas iniciais tratando-se assim, de um evento genético tardio. A metilação é também fortemente relacionada à carcinogênese do CCR serrilhado^{26, 27} sendo observada em lesões serrilhadas precursoras e em maior frequência em pólipos serrilhados localizados no cólon direito¹⁸. A hiper-metilação é mais frequentemente associada com mutações *BRAF* que com mutações *KRAS* em cânceres serrilhados^{21, 28}. Clinicamente, o CCR originado da via dos serrilhados difere daqueles oriundos da via dos adenomas, no que diz respeito a sua progressão e resposta terapêutica. O adenocarcinoma serrilhado é mais propenso a uma menor probabilidade de sobrevivência em 5 anos que os cânceres convencionais²³ e as diferenças no *status* MSI podem ter implicações terapêuticas, que requerem um manejo diferenciado do paciente^{21, 29}.

1.4 Fatores moleculares do CCR

Diferentemente da falta de fatores dietéticos e de estilo de vida bem definidos, existem alterações gênicas (tanto hereditárias quanto somáticas) bem estabelecidas que influenciam diretamente na patogênese do CCR. Tais alterações são de dois tipos: aquelas que levam a uma nova/aumento da função de oncogenes e aquelas que levam a perda de função de um gene supressor tumoral³⁰⁻³².

As células neoplásicas são caracterizadas por anormalidades genéticas que podem ser usadas para definir entidades de doenças específicas e seus marcadores de prognóstico e preditivo. No CCR, anormalidades genômicas ocorrem em um padrão não aleatório na evolução adenoma-carcinoma e posteriores lesões avançadas e a formação de metástases^{33, 34}. Há três vias genéticas clássicas conhecidas na patogênese do CCR: instabilidade cromossômica (CIN - *Chromosomal Instability*), instabilidade de microssatélite (MSI -

Microsatellite Instability), e o fenótipo metilante (CIMP - *CpG Island Methylator Phenotype*)^{33, 34} (Figura 3). Estas três vias são intimamente relacionadas e, ocasionalmente, os tumores apresentam alterações em múltiplas vias. No CCR, essas alterações afetam vias de sinalização celular específicas já bem estudadas, sendo elas: WNT (em aproximadamente 90% dos casos, por meio de inativação de *APC*), MAPK (mutações mutuamente exclusivas em *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*), PI3K (mutações em *PIK3R1* e *PIK3CA* e deleções em *PTEN*), TGF- β (alterações genômicas em *TGFBR1*, *TGFBR2*, *ACVR2A*, *ACVR1B*, *SMAD2*, *SMAD3* e *SMAD4*) e p53 (alterações em *TP53* e *ATM*)^{34, 35}. Mutações em *TP53* são encontradas em 60-80% dos tumores colorretais e ocorrem na transição de adenoma para câncer (sugerindo o acúmulo dessas alterações no tecido ao longo da progressão do câncer)^{36, 37}. Mutações em *KRAS* são eventos genéticos críticos na carcinogênese do CCR (30-50% dos casos são mutados), estando associadas com a progressão de adenomas de baixo grau para adenomas de alto grau^{10, 36, 38}.



Fonte: Adaptado de Janne et al.³⁹ e de Markowitz et al.³⁴.

Figura 3 - Vias moleculares envolvidas na patogênese do CCR. (a) Instabilidade cromossômica (CIN): mutações inativadoras de ambos os alelos de genes supressores tumorais, mutações ativadoras de um alelo de oncogenes, perda de heterozigosidade (LOH) e aneuploidias. (b) Instabilidade de Microssatélites (MSI): mutações em genes responsáveis pelo *Mismatch Repair* desencadeiam alterações em diversos genes relacionados a funções como: proliferação, sinalização celular, apoptose e reparo de danos. (c) Fenótipo metilante (CIMP): via epigenética ocasionada por hipermetilação de região promotora de *MLH1* e mutação em *BRAF*.

A maioria dos casos de CCR (85-90%) surge por meio da via de instabilidade cromossômica (CIN)³⁴. Alterações causadas por rearranjos estruturais cromossômicos, ampliações e deleções cromossômicas, com variação no número de cópias, são eventos

comuns para esta via. Como principais consequências obtidas com a CIN observa-se: a perda de genes supressores tumorais e/ou amplificação de oncogenes nas regiões afetadas^{34, 35}.

Tumores com CIN apresentam um perfil não hipermutado, isto é, não possuem elevadas taxas de mutação em todo o seu genoma, mas mesmo assim, apresentam mutações em genes característicos (*APC*, *TP53*, *KRAS*, *PIK3CA*, *FBXW7*, *SMAD4*, *TCF7L2* e *NRAS*), como evidenciado pelo consórcio TCGA (The Cancer Genome Atlas)³⁵. Os genes *KRAS* e *NRAS* apresentam mutações oncogênicas (ativadoras) nos códons 12/13 ou 61, enquanto os demais genes apresentam mutações inativadoras³⁵. É importante também destacar que dentre os tumores não-hipermutados, não há diferenças entre o padrão geral de alterações no número de cópias gênicas, no perfil de metilação, de mRNA e de miRNA que possa distinguir entre carcinoma de cólon e carcinoma de reto^{34, 35}.

Em contraste, a MSI é menos comum e é mais provável de estar associada com CCR hereditário, além de apresentar um melhor prognóstico^{16, 34}. Acredita-se que as vias CIN e MSI conduzam a diferentes caminhos no desenvolvimento do CCR³⁴. Ao contrário dos tumores com CIN, os casos com MSI (tumores que apresentam defeitos em genes de reparo de DNA do tipo *Mismatch Repair*) apresentam um perfil hipermutado, isto é, possuem elevadas taxas de mutação em todo o seu genoma^{35, 40}. Nestes casos, os genes *ACVR2A*, *APC*, *TGFBR2*, *MSH3*, *MSH6*, *SLC9A9* e *TCF7L2* são frequentemente alvos de mutação, juntamente com mutações em *BRAF* (V600E)³⁵. No entanto, dois genes que são frequentemente mutados em tumores não-hipermutados apresentam taxa de mutação significativamente menor em tumores hipermutados, sendo eles: *TP53* (60% contra 20%, $p < 0,001$), e *APC* (81% contra 51%, $p = 0,002$)³⁵. Outros genes, incluindo *TGFBR2*, estão recorrentemente mutados nos cânceres hipermutados, mas não nos casos não-hipermutados. Isto sugere que tumores que se apresentam hipermutados ou não, progridem por meio de diferentes sequências de eventos gênicos³⁵.

O fenótipo metilante é um evento presente no CCR, independente da sua origem gênica (hereditária ou somática) e caracteriza-se principalmente pela metilação da região promotora do gene *MLH1*⁴¹. Assim como nos casos que apresentam MSI, observam-se tumores com hipermutação em todo o genoma³⁴. No entanto, tumores com metilação da região promotora do gene *MLH1* e aqueles apresentando MSI-H (por mutações gênicas) possuem um perfil mutacional diferente. Ao se analisar regiões de repetições mononucleotídicas em sequências codificantes, observa-se uma taxa de mutação 3,6 vezes

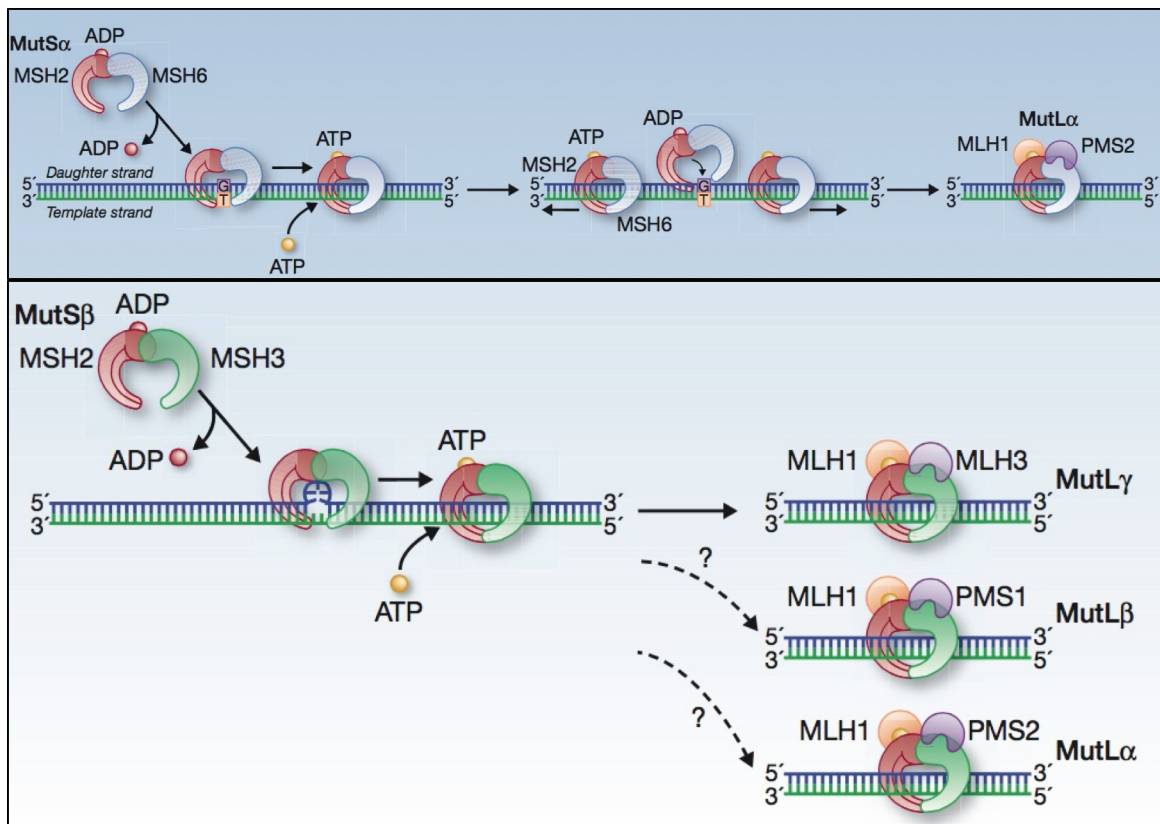
maior em amostras metiladas em relação a tumores hipermutados sem metilação de *MLH1* e de 50 vezes maior em relação a tumores não hipermetilados³⁵. Análise de perfis de metilação em regiões promotoras do DNA revela a existência de subgrupos tumorais. Subgrupos contendo tumores com elevadas taxas de metilação, classificados como CIMP-high e subgrupos com menores taxas de metilação, classificados como CIMP-low³⁵.

Em conjunto, as características moleculares acima descritas encontradas no CCR foram a base para uma classificação em cinco grupos elaborada por J R Jass em 2007, dependendo da presença de CIN, MSI ou CIMP e de mutação nos genes *KRAS* ou *BRAF*¹⁴. Baseado nessa classificação foram apresentados os grupos: Tipo 1 (CIMP-high/MSI-H/*BRAF* mutado), Tipo 2 (CIMP-high/MSI-L ou MSS/*BRAF* mutado), Tipo 3 (CIMP-low/MSS ou MSI-L/*KRAS* mutado), Tipo 4 (CIMP-neg/MSS) e Tipo 5 ou Síndrome de Lynch (CIMP-neg/MSI-H). As vias moleculares foram determinadas num estágio precoce (lesões pré-cancerosas) da doença. Os pólipos serrilhados foram apontados como precursores dos Tipos 1 e 2, os adenomas para os Tipos 4 e 5, enquanto que para o Tipo 3 qualquer pólio atua como lesão precursora¹⁴. Os Tipos 1 e 4 não apresentam sobreposições moleculares uns com os outros, enquanto que os Tipos 2, 3 e 5 combinam as características moleculares dos Tipos 1 e 4 de diferentes maneiras¹⁴.

Recentemente, com o advento dos sequenciadores de nova geração e das ferramentas de bioinformática de análise em larga escala, diversas amostras tumorais vêm sendo analisados por consórcios internacionais, como o TCGA³⁵ e sendo apresentadas em trabalhos^{42, 43} de grande impacto científico. Essas abordagens geram resultados que permitem novas classificações e interpretações de tipos tumorais. Visto isso, um consórcio internacional (The CRC Subtyping Consortium - CRCSC) propôs uma nova classificação em subtipos para o CCR, através de análise bioinformática de perfis de expressão gênica⁴⁴. Esta propôs a divisão em quatro subtipos moleculares de consenso (Consensus Molecular Subtypes – CMS): CMS1 (casos hipermutados (CIMP-H), MSI-H, *BRAF* mutado, forte ativação imunológica e pólipos serrilhados como lesão precursora), CMS2 (CIN, ativação das vias WNT e MYC e adenomas como lesão precursora), CMS3 (podem ser MSI ou CIN, mas apresentam *KRAS* mutado e desregulação metabólica) e CMS4 (CIN, ativação de TGF- β e angiogênese)⁴⁴. Os autores consideram esses grupos como o produto do sistema de classificação mais robusto disponível atualmente para o CCR, com implicações biológicas, e as bases para futuras estratificações clínicas e intervenções baseadas nos subtipos⁴⁴.

1.5 Instabilidade de Microssatélites no CCR

Tumores com MSI são caracterizados por apresentarem defeitos em genes de reparo de DNA “*Mismatch Repair*” (MMR), tais como: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (Figura 4). Falhas neste mecanismo de reparo durante a replicação do DNA geram inserções ou deleções de bases^{45, 46}. Este fenômeno causa o surgimento de novos alelos detectáveis, com uma alteração no tamanho do alelo entre DNA tumoral e normal.



Fonte: Adaptado de Sinicrope et al.⁴⁷.

Figura 4 - Atuação das proteínas do *Mismatch Repair* (MMR). Quadro superior: Erro de pareamento de um par de base reconhecido pelo complexo MSH2-MSH6 e ligado para correção pelo complexo MLH1-PMS2. Quadro inferior: Erro de inserção de bases reconhecido pelo complexo MSH2-MSH3 ou MSH2-MSH6 e ligado para correção pelos complexos MLH1-MLH3, MLH1-PMS1 e MLH1-PMS2.

Microssatélites são sequências simples de DNA que consistem de uma unidade de repetição de 1-5 pares de base (pb) com 25-60 pb de comprimento. A expansão ou a

contração destas sequências, devido ao aumento ou diminuição nas unidades de repetição dá origem ao que é referido como instabilidade de microssatélites (MSI). A MSI é detectada entre 10-15% dos CCRs esporádicos e em aproximadamente 100% dos casos de síndrome de Lynch (ou câncer colorretal hereditário não polipóide - HNPCC)⁴⁸. Entre 75-80% dos casos esporádicos ocorre devido a perda da atividade do MMR causada por hipermetilação do promotor do gene *MLH1*^{34, 41, 49, 50}. Embora o CCR com MSI ocorra preferencialmente no cólon direito, é raramente encontrado na porção esquerda. No entanto, o fenótipo MSS (estabilidade de microssatélite) é a principal característica molecular em ambos os lados do cólon, sendo observada uma frequência de 60% no lado direito e de 90% no lado esquerdo^{8, 9}.

Visando suprimir as discrepâncias encontradas entre resultados de diferentes estudos envolvendo MSI, o *National Cancer Institute/International Collaborative Group* - HNPCC (NCI/ICG-HNPCC) recomendou em 1998 que o procedimento padrão fosse a análise de um painel composto por regiões de microssatélite⁵¹. Este painel ficou conhecido como Painel de Bethesda e era composto por 5 marcadores: 2 mononucleotídicos (BAT25 e BAT26) e 3 dinucleotídicos (D5S346, D2S123 e D17S250). Usando este painel de referência, três fenótipos de MSI são descritos: alta instabilidade de microssatélite (MSI-H), baixa instabilidade de microssatélite (MSI-L) e estabilidade de microssatélite (MSS)⁴⁵. A MSI-H é caracterizada pela presença de instabilidade em mais de 40% dos marcadores examinados (ao menos 2 de 5 marcadores), a MSI-L é caracterizada pela presença de menos de 40% dos marcadores instáveis (1 de 5 marcadores) e a ausência de instabilidade (zero de 5 marcadores) caracteriza os tumores MSS⁴⁵. Após esse painel, outros foram sugeridos usando marcadores tetra, di ou mononucleotídicos para determinação do *status* de MSI. No entanto, todas essas variações nos painéis necessitam de padronização para a população em análise e ainda mais, a necessidade de inclusão de DNA proveniente de tecidos normais (*matched-normal DNA*) para servir de referência nas análises^{45, 46, 52}.

Em 2002, o *National Cancer Institute* (NCI) realizou um workshop para reavaliar os procedimentos padrões sugeridos em Bethesda^{45, 48}. Neste workshop concluiu-se a existência de limitações no uso dos marcadores citados anteriormente e foi recomendada a substituição dos dinucleotídicos por mononucleotídicos. Assim, o painel sugerido era composto de 5 marcadores mononucleotídicos (BAT25, BAT26, NR21, NR24 e NR27) e não se fazendo mais necessária a comparação com DNA de tecido normal^{52, 53}.

Devido à presença generalizada de regiões de microssatélites por todo o DNA, em casos exibindo MSI são esperadas mutações em todo o genoma das células tumorais. Estas alterações podem contribuir para a tumorigênese, se localizadas em sequências codificadoras, de tal forma que alterem as proteínas e ainda podem estar localizadas em regiões intergênicas não-reguladoras^{54, 55}. Genes que abrigam mutações em microssatélites, devido ao fenótipo MSI são comumente designados: genes MSI-alvo. Existem vários genes MSI-alvo descritos, porém a relevância deles no desenvolvimento do câncer não é clara^{54, 55}. Alguns destes genes como *TGFBRII* e *BAX* são frequentemente mutados no câncer colorretal MSI-positivo^{54, 55}, enquanto que outros genes, como *IGFRII*, *TCF4* e *AXIN*, foram relatados com menores frequências^{54, 55}. Para que as mutações exerçam efeito máximo, os genes MSI-alvo precisam apresentar alterações em ambos os alelos, no entanto observam-se alterações mono-alélicas na maioria dos casos. Isto implica que a inativação de um único alelo pode resultar na produção de quantidades insuficientes de um produto gênico em particular (haplóide-insuficiência), que seria suficiente para promover a carcinogênese^{40, 56-58}. De forma elucidativa, o trabalho de Kim et al.⁴² apresentou uma ampla análise compreensiva do genoma de casos de CCR com MSI quanto a prevalência de mutações, ao espectro de alterações e as consequências funcionais das alterações nos microssatélites. Os seus resultados forneceram um visão geral da MSI em genomas de câncer, destacando sua especificidade ao tipo tumoral, o impacto na expressão gênica e o papel na organização da cromatina. Outro trabalho que exemplifica a importância da MSI sobre os genes MSI-alvo é o de Hause et al.⁴³. Neste trabalho, a importância da MSI foi demonstrada em 18 tipos tumorais diferentes (como, cólon, reto, endométrio, estômago, pulmão, próstata, ovário etc) e as análises ofereceram uma visão sobre as características da MSI que são conservadas entre tipos tumorais diferentes, tanto quanto as que são específicas e ainda, revelaram aspectos que possam melhorar o diagnóstico clínico e a descoberta de novos genes ligados aos cânceres em análise⁴³.

O câncer colorretal com MSI parece estar relacionado a determinadas características clínicas e histopatológicas distintas de casos MSI-negativos. Dentre essas características podemos destacar: localização tumoral no cólon proximal, alta infiltração de linfócitos, baixa frequência de metástases a distância e um melhor prognóstico^{54, 55}. Tem-se a hipótese de que, em uma fase avançada de transformação, a alta frequência de mutações características destes tumores pode tornar as células tumorais mais imunogênicas, uma vez que uma

evidente infiltração intra-epitelial de linfócitos T e agregados de células B nodulares são detectados em tumores MSI-positivos. Portanto, uma forte resposta imune contra células deficientes MMR pode diminuir seu potencial de invasão e metástase, e, possivelmente, explica porque tumores colorretais MSI-positivos têm melhor prognóstico^{33, 40, 47, 57, 58}.

No entanto, enquanto tumores MSI-positivos apresentem um melhor prognóstico em relação a outros tumores colorretais, as células com deficiência de MMR demonstram-se resistentes a certas drogas utilizadas no tratamento, como o 5-fluorouracil (5-FU), embora existam evidências contraditórias neste tópico^{40, 56-58}. Recentemente, o *status* de MSI ganhou destaque como novo potencial biomarcador de sensibilidade aos novos regimes de imunoterapia. Casos MSI-positivos foram listados como bons respondedores clínicos (fator preditivo) para tratamentos envolvendo anti-PD-1 (pembrolizumab)⁵⁹. Esta estratégia explora a elevada infiltração linfocitária presente nos casos MSI-positivos, que podem ativar a resposta imune com base nos antígenos gerados pelas altas taxas de mutação (falha no *Mismatch repair*) observada nestes casos²¹.

Portanto, a MSI é um marcador molecular útil não só para fins de diagnóstico, de diferenciação de natureza esporádica *versus* hereditária e de prognóstico, mas também para a previsão terapêutica em pacientes com CCR, sendo atualmente um biomarcador crucial para o CCR⁶⁰.

1.6 Instabilidade de Microssatélites no CCR – Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch (ou câncer colorretal hereditário não polipóide - HNPCC) é uma síndrome de predisposição hereditária com herança autossômica dominante, responsável por aproximadamente 5% dos casos de CCR^{61, 62}. Causada por mutações germinativas, principalmente nos genes de reparo de DNA do MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) e caracterizada pelo risco aumentado de desenvolvimento de CCR e de endométrio com idade abaixo dos 50 anos, além de risco moderado para cânceres de estômago, intestino delgado, bexiga urinária e ovário⁶¹⁻⁶³. Ainda com um aumento no risco de desenvolvimento de múltiplos tumores, com aproximadamente 18% dos casos apresentando tumores sincrônicos e cerca de 50% tumores metacrônicos^{62, 64}.

Um desafio presente para a clínica oncológica é a correta identificação de pacientes acometidos pela Síndrome de Lynch e a precisa detecção de familiares portadores de alterações. O correto rastreamento dos portadores é importante para a prevenção do

surgimento da doença ou mesmo para a detecção precoce, aumentando as probabilidades de cura. Visando uma clara identificação, classificação e padronização no diagnóstico clínico de pacientes e familiares em risco, *guidelines* internacionais (critérios clínicos) foram estabelecidos com destaque para os de Amsterdam e Bethesda (Quadro 1).

Devido as características genéticas da Síndrome de Lynch e por os *guidelines* serem de difícil aplicação e de baixa especificidade, a análise de MSI torna-se um dos critérios mais relevantes para a identificação de pacientes ou famílias acometidas. Com isso, o rastreamento molecular foi proposto⁶⁵ para todos os pacientes com CCR (principalmente aqueles com menos de 70 anos) e diversos estudos⁶⁶⁻⁶⁸ realizados reportaram que esta metodologia contribuiu pra a identificação de considerável número de portadores de mutações nos genes do MMR (2,4 a 3,7% dos casos testados). Ainda, relataram que de 12 a 28% dos casos não seriam diagnosticados, caso os critérios clínicos fossem exclusivamente utilizados para rastreamento⁶⁹. Recentemente, a análise dos genes do MMR por meio de técnicas moleculares ou imunoistoquímica é considerada fundamental para o rastreio da Síndrome de Lynch, enquanto que a identificação de mutações germinativas é o critério final para o diagnóstico da síndrome em pacientes selecionados pelo rastreio molecular, evidenciando o papel fundamental da MSI no contexto clínico dessa doença.

Quadro 1 – *Guidelines* e seus critérios para diagnóstico da Síndrome de Lynch considerando história clínica e familiar de câncer.

Amsterdam I
(todos os critérios devem ser atendidos para se fazer o diagnóstico)
1 - Famílias com 3 casos de CCR em que 2 dos indivíduos afetados são parentes em 1º grau do terceiro; 2 - Famílias com casos de CCR em no mínimo 2 gerações; 3 - Famílias com 1 caso de CCR antes dos 50 anos de idade; 4 - Exclusão do diagnóstico de PAF (polipose adenomatosa familiar);
Amsterdam II
- Três familiares com neoplasia associada à Síndrome de Lynch (além de CCR, incluem: tumores de endométrio, estômago, intestino delgado, hepatobiliares, pelve renal e ureter), sendo um parente em 1º grau dos outros dois, envolvendo pelo menos 2 gerações e com um ou mais casos diagnosticados antes dos 50 anos de idade;
Bethesda
(o preenchimento de todos os aspectos de um item apenas é suficiente para o diagnóstico)
1 - CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade; 2 - Presença de CCR sincrônico ou metacrônico, ou outro tumor de espectro Lynch independente da idade; 3 - CCR com histologia sugestiva de alta instabilidade de microsatélites antes dos 60 anos de idade; 4 - Probando com CCR e um ou mais familiares de 1º grau com tumor do espectro Lynch, sendo um dos tumores diagnosticados antes dos 50 anos; 5 - Probando com CCR e dois ou mais familiares de 1º grau ou 2º grau com tumores do espectro Lynch diagnosticados em qualquer idade;

Fonte: Adaptado de Syngal et al.⁷⁰

1.7 Ancestralidade no câncer

A variação fisiológica/patológica observada entre os indivíduos é produto da variação genética de cada um. Os dois componentes principais desta variabilidade genética são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNP - *single-nucleotide polymorphisms*) e as variações no número de cópias (CNV - *copy-number variation*). Inúmeros SNPs já foram descobertos e a nível nucleotídico, os genomas de dois indivíduos divergem na razão de 1 em 1000 pb. As variações no número de cópias são menos comuns, mas contribuem com um adicional de 0,4% na divergência entre dois genomas. Quaisquer dois indivíduos podem ser 99,5%

idênticos a nível de sequências de DNA, refletindo uma relativa recente origem de nossa espécie⁷¹.

Estudos mostram que a grande maioria da variação genética (85-90%) pode ser encontrada dentro de qualquer população humana, sendo que somente 10-15% de variação é acrescida quando considerada toda a população humana^{72, 73}, corroborando a similaridade genética entre pessoas de diferentes ancestralidades⁷³. Ocasionalmente, uma variante (SNP ou variação no número de cópias) é relativamente comum em uma população, mas ausente (ou quase) em outra. Isto pode ocorrer devido ao recente surgimento de uma variante que ainda não se espalhou a outras populações⁷¹.

Uma forte correlação entre localização geográfica e similaridade genética é geralmente observada em comparações de prevalência de variantes (SNPs e variações de número de cópias) entre populações^{71, 74}. Estudos populacionais demonstram que populações africanas têm relativamente maior diversidade genética do que outras populações e que a variação encontrada fora da África tende a ser um subgrupo de variação genética africana. Apoiando assim, a origem africana de nossa espécie^{74, 75}.

Visto essa prevalência de determinadas variantes em diferentes populações isoladas geograficamente, e o fato de podermos analisar um grande número de polimorfismos, a ancestralidade individual pode ser inferida. Mais recentemente, analisando-se milhares de SNPs, os pesquisadores foram capazes de inferir a ancestralidade individual mais precisamente, frequentemente atribuindo ascendência para regiões geográficas específicas⁷⁵⁻⁷⁷. A determinação da ancestralidade é possível porque mesmo que poucas variantes estejam presentes em uma população, elas estão presentes em quase a totalidade dos indivíduos dessa população e ausentes nos membros de outra população⁷⁸.

Embora a ancestralidade possa ser determinada com análises genéticas, a compreensão destes dados mostra que as categorias populacionais não são entidades discretas, facilmente distinguíveis. Muitas populações, tais como afro-americanas e hispano-americanas, apresentam uma complexa recente ancestralidade. Os afro-americanos, em média, apresentam cerca de 20% de ascendência europeia⁷⁹, mas essa proporção varia substancialmente entre diferentes populações afro-americanas na América do Norte^{80, 81}. Além disso, análises genéticas de ancestralidade de indivíduos que se autodeclararam afro-americanos demonstraram elevadas proporções (mais de 50%) de ascendência genética

européia, enquanto alguns autodeclarados europeus americanos apresentaram ascendência genética africana substancial^{81, 82}.

O CCR representou 9% de todos os cânceres diagnosticados nos EUA em 2012, embora a taxa de incidência tenha evidenciado um lento e constante declínio há quase 30 anos, antes mesmo da generalização dos programas de rastreio⁸³. Em contraste com o declínio geral, dados do SEER (*Surveillance Epidemiology and End Results*) mostram que desde 1992 a incidência do CCR está aumentando entre os adultos com menos de 50 anos. Alguns estudos^{84, 85} têm sugerido que a ocorrência em jovens parece afetar desproporcionalmente pacientes não-brancos de determinadas localidades dos EUA. A menor média de idade de desenvolvimento de CCR em afro-americanos fez com que algumas organizações médicas passassem a recomendar, nos programas de rastreio, a diminuição da idade de inclusão (atualmente 50 anos de idade em brancos não-hispânicos) para o grupo dos afro-americanos⁸⁶. As diferenças étnicas entre os pacientes com CCR foram também descritas em relação a enzimas metabolizadoras de drogas, a respostas tumorais e a taxas de toxicidade da droga⁸⁷.

Com esses dados epidemiológicos pode-se observar uma diferença no curso de desenvolvimento da doença inerente ao grupo étnico originário de cada paciente. Assim como em diversas outras patologias, o câncer também sofre influências genéticas ligadas a ancestralidade. Para os casos americanos de CCR, sabe-se que determinadas características clínico-patológicas são mais frequentes em pacientes afro-americanos e outras em brancos não-hispânicos. Como exemplo podemos citar o fato de afro-americanos terem uma maior incidência de adenomas e câncer comparados aos brancos não-hispânicos nos últimos 30 anos^{83, 88}. Esse fato é muito importante pois, o local de desenvolvimento do tumor tem importantes implicações não só relacionadas com o rastreio, mas também às características biológicas distintas e prognóstico⁵⁶. Podemos ainda relacionar a localização (proximal/distal) da lesão com características genéticas, como por exemplo: presença de MSI, hipermetilação e elevada taxa de alteração em genes MSI-alvo. Com isso, alguns autores sugerem uma maior propensão de afro-americanos apresentarem MSI e hipermetilação em ilhas CpG, podendo estas diferenças terem implicações prognósticas e terapêuticas, além de uma maior inclusão de pacientes jovens com origem africana nos programas de rastreio^{35, 89}.

Trabalhos na literatura como o de Xicola et al.⁸³ e o de Yoon et al.⁹⁰ reportam diferenças em características genéticas como, presença de mutações em *KRAS* e *BRAF* em

diferentes grupos étnicos de pacientes americanos. Em Yoon et al.⁹⁰ onde foram analisados pacientes com doença estágio III, brancos apresentaram mais que duas vezes a frequência de mutação em *BRAF* que em pacientes negros e asiáticos. Mutações *KRAS* foram mais frequentes em negros e tumores não mutados para *KRAS* e *BRAF* foram mais frequentes entre os asiáticos. Ainda para os asiáticos tem-se uma tendência de menor taxa de fumantes e obesos quando comparados com os brancos e negros. Além disso, apresentam tumores com localização no cólon distal, proficientes para o MMR e com provável origem em pólipos adenomatosos⁹⁰.

1.8 Ancestralidade no Brasil

O Brasil é o maior país da América Latina com mais de 200 milhões de habitantes. Essa população é altamente diversificada e miscigenada, sendo o resultado de populações ameríndias, colonizadores/imigrantes europeus e escravos africanos. Com relação aos escravos africanos, o Brasil recebeu aproximadamente 4 milhões durante o período de escravidão, enquanto os EUA receberam aproximadamente 600 mil, ou seja, sete vezes mais africanos em nosso território^{91, 92}.

A ancestralidade genômica no Brasil, assim como na América Latina, apresenta conflitante correlação com fenótipos bem distintos, como: cor da pele, etnia autodeclarada, características socioculturais e status socioeconômico. Além disso, após séculos de miscigenação observa-se uma preferência em relações interpessoais onde os indivíduos envolvidos são da mesma ascendência e seus fenótipos morfológicos e características socioeconômicas são correlacionados, uma tendência também observada em outros países do continente^{91, 93}. Outro ponto importante do processo de formação e miscigenação da população brasileira é o fato de nunca ter existido leis de segregação, como observado nos EUA e na África do Sul. Isto permitiu que a composição da população fosse altamente miscigenada e a sua classificação e percepção étnica de cada indivíduo fosse mais complexa que naqueles que apresentaram políticas de segregação racial^{92, 94}. A miscigenação presente no Brasil permite questionar-se como a classificação étnica se correlaciona com a ancestralidade genômica dos brasileiros e assim temos inúmeros trabalhos baseados em diversos marcadores informativos mostrando resultados conflitantes sobre isto⁹⁵⁻⁹⁸.

Por apresentar um tamanho continental, no Brasil temos regiões com características ancestrais particulares e ainda, diferenças dentro de uma mesma região devido

principalmente ao tamanho populacional da região e ao fluxo de pessoas que ela possui^{91, 98}. No trabalho de Lima-Costa et al.⁹², temos que nas populações analisadas (Nordeste (Salvador), Sul (Pelotas) e Sudeste (Bambui)) há uma significativa associação entre o fenótipo e a ancestralidade genômica e que a associação entre a ancestralidade auto-declarada e a genômica para os brancos e negros, foi maior nos extremos da proporção da ancestralidade africana. Ainda nesse trabalho, observa-se que a ancestralidade africana é maior no Nordeste do país, assim como a europeia está mais presente no Sul e Sudeste. Ainda temos que a contribuição dos povos ameríndios está concentrada principalmente na região Norte (Amazônia) visto que nas três populações analisadas a proporção dessa ancestralidade foi muito baixa⁹². Esse panorama de diversidade ancestral está descrito também nos trabalhos de Alves-Silva et al.⁹⁹ e de Pena et al.¹⁰⁰ onde a análise de haplótipos de DNA mitocondrial revelou que a região Norte apresenta uma grande influência de ameríndios, a Nordeste tem forte presença de africanos e a Sudeste é composta principalmente de europeus. Ainda, analisando-se a população brasileira quanto a cor autodeclarada e as regiões do país, observa-se uma fraca relação entre a cor e a ancestralidade brasileira¹⁰⁰⁻¹⁰².

Com esse panorama geral apresentado sobre o câncer colorretal (elevada incidência, características clínico-patológicas, mecanismos de carcinogênese, instabilidade genômica e influências da ancestralidade), o presente trabalho se justifica: pela ausência de uma análise sistemática deste tipo tumoral em casos brasileiros; desconhecimento da frequência de MSI, suas causas e seu impacto nos genes MSI-alvo e qual o contributo da ancestralidade genética e sua interação com o fenótipo MSI e com o perfil clínico-patológico.

2 OBJETIVO

O objetivo geral deste projeto é elucidar o impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélite (MSI) em pacientes com câncer colorretal do Hospital de Câncer de Barretos.

2.1 Objetivos específicos

- I) padronizar e implementar a técnica de análise de MSI para a população brasileira, no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos;
- II) determinar a frequência de MSI e correlacionar com a expressão das enzimas de reparo de DNA do tipo *Mismatch Repair* (MMR);
- III) nos casos com MSI-H, avaliar a presença de mutações em um painel de 24 genes MSI-alvo pré-selecionados com base na literatura;
- IV) nos casos com MSI-H, analisar o status de metilação da região promotora do gene *MLH1* e avaliar a presença de mutação no gene *BRAF* (V600E);
- V) determinar a ancestralidade dos pacientes por meio de marcadores moleculares e correlacionar com os dados genéticos e características clínico-patológicas;
- VI) correlacionar as características clínico-patológicas dos pacientes com os dados genéticos;

3 MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo foi avaliado e aceito para realização pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos com o processo nº 600/2012 (Anexo A).

Foram incluídos 1013 pacientes diagnosticados entre 2010 e 2014 com câncer colorretal e sujeitos a cirurgia pelo Departamento de Digestivo Baixo do Hospital de Câncer de Barretos. Após cirurgia, o material desses pacientes passou por análises de rotina junto ao Centro de Diagnóstico Molecular (análise de MSI) e do Laboratório de Patologia (análise de imunoistoquímica de proteínas de reparo de DNA do tipo MMR) do Hospital de Câncer de Barretos.

Durante o período de inclusão dos pacientes, aqueles diagnosticados com Síndrome de Lynch foram excluídos. Posteriormente, no momento do início das análises estatísticas (Março/2016), casos com menos de 50 anos e com história familiar de câncer foram encaminhados para a consulta de aconselhamento genético junto ao Departamento de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos, mas permaneceram na casuística do presente trabalho. Permaneceram 22 pacientes, sendo 6 deles com confirmação de Síndrome de Lynch.

3.1 Dados demográficos e clínico-patológicos

Foram coletados dos prontuários, por meio de ficha de coleta estruturada (Anexo C): dados demográficos, dados de diagnóstico, dados de tratamento cirúrgico, dados de tratamento adjuvante e neoadjuvante, dados de tratamento paliativo e dados de sobrevivência global. A coleta foi realizada e fez parte de um projeto de mestrado de um aluno (médico oncologista) do nosso grupo de pesquisa.

Para registro e arquivo das informações, bem como o posterior processamento estatístico, foi criado um banco de dados específico no *software* SPSS versão 21 (IBM), com todos os dados coletados.

3.2 Obtenção de DNA de indivíduos saudáveis e de pacientes com câncer colorretal

O DNA de indivíduos saudáveis foi isolado do sangue utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O DNA tumoral foi isolado utilizando-se o kit de extração QIAamp DNA Micro kit (Qiagen), de

acordo com as instruções do fabricante. Nos casos com MSI-H ou MSI-L, o DNA germinativo do paciente foi extraído de tecido colorretal normal proveniente de outro bloco de parafina do paciente. Todo o material extraído foi posteriormente acondicionado a -30 °C para as posteriores análises.

3.3 Análise de Instabilidade de Microssatélite (MSI)

Para o estudo de MSI, foi realizada uma reação de PCR em multiplex composto por 5 marcadores mononucleotídeos quasimonomórficos (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26), segundo metodologia descrita previamente pelo nosso grupo^{103, 104}.

Um par de primers para cada marcador foi adicionado à reação, sendo que o *primer forward* estava conjugado a moléculas fluorescentes: BAT26–FAM, BAT25–HEX, NR24–NED, NR21–FAM e NR27–HEX. Para a reação de PCR foi utilizado 1 µL de mix de *primers* em concentração de 10 mM. Além disso, 5 µL de Master Mix Multiplex (Qiagen), 3 µL de água e 1 µL de DNA com concentração de 50 ng/µL foram adicionados, totalizando um volume final de 10 µL. As condições de ciclagem no termociclador foram as seguintes: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 55 °C por 90 s e 72 °C por 30 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 40 minutos e temperatura de *stand by* de 4 °C.

Os produtos de PCR foram então preparados para a eletroforese capilar adicionando-se 1 µL do produto amplificado, 8,7 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e 0,3 µL de GeneScan 600 LIZ *size standard* (Applied Biosystems).

A análise de fragmentos dos produtos de PCR foi realizada no sistema 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo equipamento 3500 Genetic Analyzer foram analisados pelo *software* GeneMapper versão 4 (Applied Biosystems). Para isso, cada marcador teve seu tamanho em pares de base (pb) pré-definido para que o status de MSI fosse definido como: MSI-High (MSI-H, instabilidade em 2 ou mais marcadores); MSI-Low (MSI-L, instabilidade em 1 marcador) e estabilidade de microssatélite (MSS, ausência de instabilidade).

3.4 Análise de imunoistoquímica das proteínas do MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)

Cortes histológicos de 3 micrometros em lâminas marcadas foram realizados para análise de imunoistoquímica utilizando o método do complexo avidina-biotina-peroxidase com o sistema de detecção Dako EnVision™ FLEX (Dako) e o equipamento Autostainer Link 48 (Dako), de acordo com as especificações do fabricante.

O processo de recuperação antigênica foi realizado a 97° C por 20 minutos (pH 9,0). Peroxidases endógenas foram bloqueadas com reagente de bloqueio EnVision FLEX (Dako). Os anticorpos primários utilizados foram: anti-MLH1 monoclonal (diluição 1:100, clone G168-728, Cell Marque®), anti-MSH2 monoclonal (diluição 1:100, clone G219-1129, Cell Marque®), anti-MSH6 monoclonal (diluição 1:600, clone 44, Cell Marque®) e anti-PMS2 monoclonal (diluição 1:25, clone MRQ-28, Cell Marque®), sendo o tempo de incubação de 20, 20, 20 e 30 minutos, respectivamente. A solução DAB foi utilizada para visualização, as lâminas foram contra coradas com hematoxilina e montadas com Entellan® (Merck Millipore).

A marcação nuclear de células epiteliais normais, linfócitos e células estromais serviram como controles positivos internos em cada caso. Todos os casos foram analisados por um patologista que, baseado na marcação nuclear, classificou cada proteína quanto a sua expressão. Não importando a intensidade ou a extensão da marcação celular, conferiu-se o *status* positivo para os casos que apresentaram marcação (presença da expressão da proteína em análise) e o *status* negativo quando não apresentou marcação (ausência da expressão da proteína em análise).

3.5 Estudo de potenciais genes MSI-alvo

Para o estudo de potenciais genes MSI-alvo foram selecionados, por meio de artigos da literatura, genes que continham regiões de microssatélite na sua constituição e que foram relatados como importantes na carcinogênese. Nas suas avaliações, foram realizadas PCR multiplex nos tumores classificados como MSI-H para um painel de 24 genes, sendo eles: *TCF4*, *XRCC2*, *MBD4*, *MRE11*, *ATR*, *MSH3*, *RAD50*, *MSH6*, *BAX*, *DNAPKc*, *BRCA1*, *BRAC2*, *WISP3*, *BLM*, *PTEN*, *ATM*, *TGFBR2*, *XPO5*, *TRBP2*, *EGFR*, *HSP110*, *ABCC5*, *ROCK1* e *GLYR1*, de acordo com o descrito previamente pelo nosso grupo^{103, 104}.

Para a PCR dos genes MSI-alvo foram utilizados 5 µL de Qiagen multiplex PCR master mix (Qiagen), 1 µL de mix de *primers* (1 mM), 3 µL de água e 1 µL de DNA com concentração

de 50 ng/ μ L, totalizando um volume final de 10 μ L. A ciclagem foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 30 ciclos de: 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 90 s e 72 °C por 45 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 40 minutos e temperatura de *stand by* de 4 °C.

Os produtos de PCR foram então preparados para a eletroforese capilar adicionando-se 1 μ L do produto amplificado, 8,7 μ L de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e 0,3 μ L de GeneScan 600 LIZ *size standard* (Applied Biosystems).

A presença de alterações nestes genes foi verificada por meio de análise de fragmentos (produtos de PCR) no sistema 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo equipamento 3500 Genetic Analyzer foram analisados pelo *software* GeneMapper versão 4 (Applied Biosystems). O status selvagem foi conferido para a amostra cujo tamanho do fragmento do tecido tumoral foi semelhante ao do tecido normal e o status alterado foi conferido para a amostra cujo tamanho do fragmento do tecido tumoral foi diferente (para mais ou para menos) ao do tecido normal.

3.6 Análise da metilação da região promotora do gene *MLH1*

Para a análise da metilação da região promotora do gene *MLH1*, o DNA das amostras analisadas passou por um tratamento com bissulfito de sódio. Utilizou-se o kit EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante.

Neste tratamento, o bissulfito de sódio (juntamente com elevada temperatura e baixo pH) promove a deaminação de citosinas não-metiladas em uracilas e mantém as citosinas metiladas como citocinas, já que o grupamento metil protege o DNA contra a deaminação. Mediante isso, é possível identificar as regiões metiladas nas sequências a serem analisadas. Na reação foram utilizados 200 ng de DNA, 85 μ L de Bisulfite Mix, 35 μ L de DNA Protect Buffer e água para um volume final de 140 μ L. Essa reação passou pela seguinte ciclagem: desnaturação a 95 °C por 5 minutos, incubação a 60 °C por 25 minutos, desnaturação a 95 °C por 5 minutos, incubação a 60 °C por 85 minutos, desnaturação a 95 °C por 5 minutos, incubação a 60 °C por 175 minutos e *stand by* a 20 °C por tempo indeterminado. Posteriormente, realizou-se um *clean-up* do DNA tratado, de acordo com as instruções do fabricante. Todo o DNA tratado foi armazenado em -30 °C.

Os *primers* de *MLH1* utilizados para a PCR prévia ao pirosequenciamento foram os do kit Pyromark Q24 CpG *MLH1* (Qiagen), seguindo as instruções do fabricante. Para essa reação de PCR foram utilizados 12,5 µL de Master Mix Multiplex (Qiagen), 2,5 µL de Q-Solution (Qiagen), 0,5 µL de cada *primer*, 4 µL de água e 5 µL de DNA tratado com bissulfato de sódio. A ciclagem foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 45 ciclos de: 95 °C por 20 s, 55 °C por 20 s e 72 °C por 20 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 5 minutos e temperatura de *stand by* de 4 °C. Após essa reação de PCR, 10 µL do produto amplificado foi imobilizado em *beads*, purificado por lavagens e preparado para sequenciamento em uma *workstation* utilizando o kit de soluções e reagentes do PyroMark Q24 (Qiagen), de acordo com instruções do fabricante.

Por meio de pirosequenciamento, analisamos a porcentagem de metilação das ilhas CpG da região promotora do *MLH1*. Na técnica do pirosequenciamento, o DNA é sequenciado por meio da síntese de uma nova cadeia que ocorre por um complexo de reações que incluem enzimas (ATP sulfúrilase, luciferase e apirase), substratos (adenosina-5' fosfossulfato e luciferina) e nucleotídeos. O pirosequenciamento foi realizado no equipamento PyroMark Q24 (Qiagen) e analisado no *software* PyroMark v.2.0.6 (Qiagen). Para a classificação do status da metilação foi utilizado 10% como ponto de corte (amostras não-metiladas: ≤10% e amostras metiladas: >10%), baseando-se na literatura internacional^{41, 50} referente a metodologia e previamente validados.

3.7 Avaliação da presença de mutação no gene *BRAF* (V600E)

A presença de mutação no gene *BRAF* (V600E) foi realizada por meio das técnicas: sequenciamento direto de Sanger e PCR em tempo real - plataforma cobas (Roche). Para o sequenciamento direto, seguimos o protocolo descrito pelo nosso grupo¹⁰⁵. Brevemente, é realizada uma PCR da região de interesse que, para isso, foram utilizados 7,2 µL de HotStar Master Mix (QIAGEN), 5,6 µL de H₂O, 0,3 µL de cada *primer* e 0,6 µL de MgCl₂ 5 mM e 1 µL de DNA com concentração de 50 ng/µL, totalizando um volume final de 15 µL. A ciclagem foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 40 ciclos de: 95 °C por 45 s, 55,5 °C por 45 s e 72 °C por 45 s que proporcionaram

a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 10 minutos e temperatura de *stand by* de 4 °C.

Após amplificação, os produtos da PCR foram purificados com EXO-SAP (GE Technology), de acordo com as instruções do fabricante. Posteriormente, o produto da purificação foi submetido à reação de sequenciamento composta de: 1 µL de BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems), 1,5 µL de tampão de sequenciamento (Applied Biosystems) e 1 µL de cada *primer*. A reação de sequenciamento é seguida de uma etapa de purificação com BigDye XTerminator Purification Kit (Applied Biosystems), de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento direto foi realizado em equipamento 3500xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), seguindo as recomendações do fabricante. Foram sequenciadas e analisadas visualmente ambas as fitas (*Forward* e *Reverse*).

Para uma pequena fração dos casos, foi realizada a análise de *BRAF* por meio da plataforma cobas (Roche), seguindo as instruções do fabricante.

3.8 Determinação da proporção dos componentes da ancestralidade

O perfil dos componentes de ancestralidade de todos os pacientes incluídos no estudo foi determinado por meio de métodos moleculares. Utilizou-se um painel de 46 marcadores de ancestralidade (AIMs), constituídos por polimorfismos de inserção e deleção (INDELs) e utilizando os dados genéticos do painel de diversidade HGDP-CEPH (*Human Genome Diversity Project - Centre d'Etude du Polymorphisme Humain*) como referências, de acordo com trabalho de Pereira et al.¹⁰⁶.

Para a reação de PCR dos 46 marcadores (AIM-INDELs) foram utilizados 5 µL de Qiagen multiplex PCR master mix (Qiagen), 1 µL de mix de *primers* (0.1 mM), 3 µL de água e 1 µL de DNA (20ng/µL) em um volume final de reação de 10 µL. A ciclagem foi realizada nas seguintes condições: 95 °C por 15 minutos para a desnaturação inicial do DNA, seguido de 30 ciclos de 94 °C por 30 s, 60 °C por 90 s e 72 °C por 45 s que proporcionaram a desnaturação, o anelamento e a extensão, respectivamente. A extensão final foi proporcionada pela etapa de 72 °C por 60 minutos e a temperatura de *stand by* foi de 4 °C.

Os produtos de PCR foram então preparados para a eletroforese capilar adicionando-se 1 µL do produto amplificado, 8,7 µL de Hi-Di Formamide (Applied Biosystems) e 0,3 µL de GeneScan 600LIZ *size standard* (Applied Biosystems). A eletroforese capilar ocorreu no sistema 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Os dados gerados pelo equipamento

3500 Genetic Analyzer foram analisados pelo *software* GeneMapper versão 4 (Applied Biosystems).

3.9 Análise estatística

A caracterização da amostra foi realizada por meio de tabelas de frequência e/ou contingência para as variáveis qualitativas e para as variáveis quantitativas, medidas de tendência central e dispersão (média, mediana, desvio padrão, mínimo e máximo).

Para se trabalhar com a ancestralidade genômica, afim de se eliminar a correlação existente entre ela, utilizou-se a Análise de Componentes Principais e na sequência os *Scores* gerados por eles.

Para se verificar a associação entre o status de MSI com os dados demográficos e características clínico-patológicas utilizaram-se os Testes χ^2 ou Exato de Fisher e para se verificar a associação com os *Scores* dos PCA utilizamos o Teste Man-Whitney, após a verificação de normalidade pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis consideradas significativas ($p < 0,20$) foram selecionadas para se ajustar o Modelo de Regressão Logística Múltipla, por meio do qual estimamos a Odds Ratio pelo modelo final que foi composto por todas as variáveis que se mantiveram significativas conjuntamente com um nível de significância de 5%.

A probabilidade de sobrevivência foi estimada pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi realizada pelo teste Log-Rank. As características consideradas significativas ($p < 0,20$) no referido teste foram utilizadas para ajustar o Modelo de Riscos Proporcionais de Cox por meio do qual estimamos o Risco Relativo (RR). Para compor o modelo final utilizaram-se as características que se mantiveram significativas ($p < 0,05$) conjuntamente.

As análises foram realizadas utilizando o software SPSS versão 21 (IBM).

4 RESULTADOS

4.1 Dados demográficos e características clínico-patológicas

Os dados demográficos e as características clínico-patológicas dos pacientes do estudo foram adquiridos pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) do Hospital de Câncer de Barretos. As variáveis e os dados de: sexo, idade ao diagnóstico, região de residência, localização do tumor primário, estadiamento, tumor primário, linfonodos regionais, metástases, tipo histológico, grau histológico, invasão angiolinfática, invasão perineural, tumor sincrônico, cirurgia tumor primário, metástase ao diagnóstico, número de linfonodos ressecados, tratamento pré-operatório, quimioterapia neoadjuvante, quimioterapia adjuvante, tipo tratamento droga de nova geração, radioterapia, recorrência e status de sobrevivência, constam na Tabela 1.

De modo geral, 52,1% dos casos são masculinos. A média de idade ao diagnóstico dos pacientes foi de 57,8 anos com desvio-padrão de 13,9 anos. Aproximadamente 78% dos casos são provenientes da região Sudeste do país. Mais de 51% dos casos possuem o tumor primário localizado no cólon esquerdo/reto alto. O estadiamento II é o mais observado em 37% dos casos. De acordo com a classificação TNM temos: T3 em aproximadamente 67% dos casos, N0 em 54,5% e M0 em mais de 81% dos casos. O tipo histológico adenocarcinoma e grau histológico I/II é observado em 93,4% dos casos. Não se observou invasão angiolinfática e nem perineural na maioria dos casos. Em 2,2% dos casos foi observado tumor sincrônico. Aproximadamente 80% dos casos não possuíam metástase ao diagnóstico. A cirurgia do tumor primário foi realizada em 96% dos casos e mais de 76% dos casos tiveram ≥ 12 linfonodos ressecados. Como tratamento pré-operatório, tanto radioterapia quanto quimioterapia concomitante foi realizado em 90,3% dos casos. Observou-se o uso de quimioterapia neoadjuvante em 89,9% dos casos e não se observou o uso de quimioterapia adjuvante em 55,3%. Com relação ao uso de drogas de nova geração, 19,1%, 3,1% e 1,0% utilizaram Cetuximab, Bevacizumab e Cetuximab+Bevacizumab, respectivamente. A radioterapia não foi utilizada em 79,3% dos casos. Dos casos analisados, 71,9% não apresentaram recorrência e 57,1% deles estão vivos sem doença no momento da coleta dos dados (Tabela 1).

Tabela 1 - Dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes portadores de CCR coletados pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) do Hospital de Câncer de Barretos (2014 - 2015).

Variável	Categoria	Porcentagem (N)
Sexo	Masculino	52,1 (528)
	Feminino	47,9 (485)
Idade ao diagnóstico	< 50 anos	28,7 (291)
	≥ 50 e < 75 anos	60,4 (612)
	≥ 75 anos	10,9 (110)
Região de residência	Sudeste	77,7 (787)
	Centro Oeste	8,6 (87)
	Nordeste	8,1 (82)
	Sul	3,7 (37)
	Norte	1,2 (12)
	Estrangeiro	0,8 (8)
Localização do tumor primário	Cólon direito	25,2 (255)
	Cólon esquerdo/Reto alto	51,3 (519)
	Reto médio e baixo	23,5 (238)
Estadiamento	0/I	12,8 (128)
	II	37,1 (372)
	III	31,1 (312)
	IV	19,0 (190)
Tumor primário	Tis/0	2,2 (21)
	T1	3,3 (32)
	T2	12,1 (118)
	T3	66,9 (653)
	T4	15,6 (152)

(continua na próxima página)

Tabela 1 (continuação) - Dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes portadores de CCR coletados pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) do Hospital de Câncer de Barretos (2014 - 2015).

Variável	Categoria	Porcentagem (N)
Linfonodos regionais	N0	54,5 (529)
	N1 (1 a 3)	20,5 (199)
	N2 (≥ 4)	25,0 (243)
Metástases	M0	81,7 (819)
	M1a	11,9 (119)
	M1b	6,4 (64)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	93,4 (946)
	Mucinoso	5,9 (60)
	Outros	0,7 (7)
Grau histológico	Grau I/II	93,4 (930)
	Grau III/Indiferenciado	6,6 (66)
Invasão angiolinfática	Não	67,6 (629)
	Sim	32,4 (302)
Invasão perineural	Não	85,6 (739)
	Sim	14,4 (124)
Tumor sincrônico	Não	97,8 (988)
	Sim	2,2 (22)
Metástase ao diagnóstico	Não	80,8 (802)
	Sim	19,2 (190)
Cirurgia tumor primário	Não	4,0 (40)
	Sim	96,0 (972)
Número de linfonodos ressecados	< 12	23,4 (223)
	≥ 12	76,6 (729)
Tratamento pré-operatório	RT exclusiva	7,4 (13)
	QT exclusiva	2,3 (4)
	RT QT	90,3 (159)

(continua na próxima página)

Tabela 1 (continuação) - Dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes portadores de CCR coletados pela análise de prontuários no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatística) do Hospital de Câncer de Barretos (2014 - 2015).

Variável	Categoria	Porcentagem (N)
Quimioterapia neoadjuvante	Não	10,1 (18)
	Sim	89,9 (160)
Quimioterapia adjuvante	Não	55,3 (551)
	Sim	44,7 (445)
Tipo tratamento droga de nova geração	Nenhum	76,8 (317)
	<i>Cetuximab</i>	19,1 (79)
	<i>Bevacizumab</i>	3,1 (13)
	<i>Cetuximab + Bevacizumab</i>	1,0 (4)
Radioterapia	Não	79,3 (802)
	Neoadjuvante	16,4 (166)
	Adjuvante	2,2 (22)
	Paliativo	2,1 (21)
Recorrência	Não	71,9 (600)
	Sim	28,1 (235)
Status de sobrevivência	Vivo sem doença	57,1 (578)
	Vivo com doença	9,9 (100)
	Óbito por câncer	26,3 (266)
	Óbito por outras causas	4,8 (49)
	Perda de seguimento	2,0 (20)

N: número.

4.2 Padronização da técnica de análise de Instabilidade de Microssatélites (MSI)

Uma das técnicas mais comum de análise de MSI é aquela em que se realiza uma PCR *multiplex* composta de 5 marcadores mononucleotídicos (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26), que potencialmente pode ser realizada sem o uso de DNA de tecido normal como referência. Para isso, é fundamental estabelecer um intervalo de variação

quasimonomórfico (*Quasimonomorphic Variation Range* - QMVR) para cada marcador para a população em estudo, neste caso, a população brasileira.

O QMVR foi avaliado em DNA derivado de sangue de 214 indivíduos saudáveis, por meio de uma PCR *multiplex* seguido de análise de fragmento. A amplificação de todas as amostras foi realizada com sucesso para todos os cinco marcadores, obtendo-se assim 428 alelos para cada marcador. Os tamanhos dos alelos e as frequências absolutas e relativas para cada marcador estão representados na Tabela 2.

Os intervalos estabelecidos para cada marcador foram: 82–88bp para NR-27, 101–107 para NR-21, 119–125 para NR-24, 142–148 para BAT-25, e 174–180 para BAT-26. A frequência de alelos variantes para cada marcador foi variável: BAT-26 demonstrou a maior proporção de alelos variantes com 14 deles fora do intervalo; BAT-25 apresentou seis alelos fora; seguido pelo NR-21 com quatro alelos e NR-27 com apenas um. Para o NR-24, nenhum alelo foi observado fora do intervalo determinado. A determinação do QMVR dos indivíduos analisados foi baseada na metodologia proposta por Buhard et al.⁴⁵, onde se obteve a frequência média dos alelos para cada marcador e se acrescentou ± 3 alelos criando assim o intervalo de variação. O QMVR para todos os marcadores das nossas amostras difere em poucos pares de base em relação ao que já foi reportado previamente^{45, 53}.

Tabela 2 – Alelos e o QMVR (*Quasimonomorphic Variation Range*) para cada marcador.

NR-27		NR-21		NR-24		BAT-25		BAT-26	
Alelo (pb)	N (%)	Alelo (pb)	N (%)	Alelo (pb)	N (%)	Alelo (pb)	N (%)	Alelo (pb)	N (%)
80		99		118		133		163	
81	1 (0,23)	100	4 (0,97)	119		134	1 (0,23)	164	1 (0,26)
82	2 (0,46)	101	2 (0,46)	120	11 (2,57)	135		165	13 (3,07)
83	7 (1,63)	102	3 (0,7)	121	65 (15,2)	139	3 (0,69)	174	
84	119 (27,8)	103	26 (6,07)	122	263 (61,4)	140	2 (0,48)	175	11 (2,58)
85	265 (61,9)	104	195 (45,5)	123	89 (20,8)	142	1 (0,25)	176	45 (10,5)
86	32 (7,48)	105	182 (42,5)	124		143	9 (2,1)	177	212 (49,5)
87	2 (0,46)	106	16 (3,77)	125		144	55 (12,8)	178	142 (33,1)
88		107		126		145	185 (43,2)	179	3 (0,7)
89		108				146	140 (32,7)	180	1 (0,23)
						147	24 (5,6)	181	
						148	8 (1,87)	182	
						149			
						150			

O sombreado em cinza-escuro representa a média e o em cinza-claro o QMVR estabelecido para cada marcador. N: número. pb: pares de base.

Após o estabelecimento do QMVR, observaram-se 23 indivíduos (Tabela 3) com alelos fora do intervalo. Nenhum deles exibiu mais de um marcador fora do intervalo e independentemente do *cutoff* de 2/5 ou 3/5 marcadores alterados para definir o *status* MSI-H, nenhum dos indivíduos seria erroneamente classificado quanto ao *status* MSI. Sugere-se classificar como MSI-H, os indivíduos com instabilidade em dois ou mais marcadores e, visto que a instabilidade de um marcador possa ocorrer devido a polimorfismos, propomos que estes casos sejam analisados complementarmente, por imunistoquímica das proteínas de reparo do *Mismatch Repair* (MMR) ou por PCR usando DNA normal pareado, para determinar corretamente o *status* MSI-L. Assim, indivíduos com instabilidade em mais que 2 marcadores foram precisamente classificados como apresentando MSI-H e adotou-se esse critério para o presente trabalho e para a rotina de análise do Centro de Diagnóstico Molecular.

Tabela 3 – Alelos de todos os marcadores dos indivíduos com alelos fora do QMVR (*Quasimonomorphic Variation Range*).

Amostra	NR-27 (82-88)		NR-21 (101-107)		NR-24 (119-125)		BAT-25 (142-148)		BAT-26 (174-180)	
C1	85	85	100	105	122	122	145	146	177	178
C15	84	85	104	105	122	123	145	146	165	177
C3	85	85	104	105	122	123	134	146	177	178
2	85	85	103	105	120	120	139	146	177	178
13	84	85	100	104	122	123	145	146	175	176
16	84	84	104	105	121	122	144	146	165	177
22	85	85	104	104	122	123	145	145	165	176
34	85	85	105	105	120	120	139	140	177	179
36	81	85	104	105	122	122	145	146	177	178
45	85	85	105	105	122	122	145	146	165	176
49	84	85	104	105	122	123	139	146	177	178
53	84	85	103	105	122	122	144	144	165	177
56	84	85	104	105	122	122	145	146	165	176
63	85	85	104	104	121	122	144	146	165	177
75	84	85	100	105	122	122	146	146	176	177
91	85	85	100	105	122	122	144	145	177	178
97	84	85	104	105	121	122	145	145	165	177
108	82	86	105	105	121	122	145	146	165	178
125	86	86	104	104	122	122	145	146	165	177
135	85	85	102	103	122	122	144	145	165	177
136	85	85	102	103	122	122	144	145	165	177
151	85	85	105	105	121	121	145	146	165	178
162	85	86	104	105	122	122	144	145	164	177

Sombreado em cinza-claro destaca o alelo fora do QMVR.

Estes dados foram detalhadamente descritos e discutidos no artigo - *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers*¹⁰⁷ (Anexo B), publicado por nosso grupo.

4.3 Análise de Instabilidade de Microssatélites (MSI)

Foram incluídos e analisados 1013 casos de CCR quanto ao *status* de MSI. Obtivemos 85,8% (870/1013) casos MSS, 3,7% (37/1013) casos MSI-L e 10,5% (106/1013) casos MSI-H (Figura 5). Para as análises estatísticas posteriores, foram agrupados os casos MSS e MSI-L em apenas um grupo, tendo assim: MSS+MSI-L e MSI-H. Essa abordagem em apenas dois grupos é apoiada pela literatura que demonstra uma similaridade tanto clínica quanto molecular entre casos MSS e MSI-L^{14, 40, 43}.

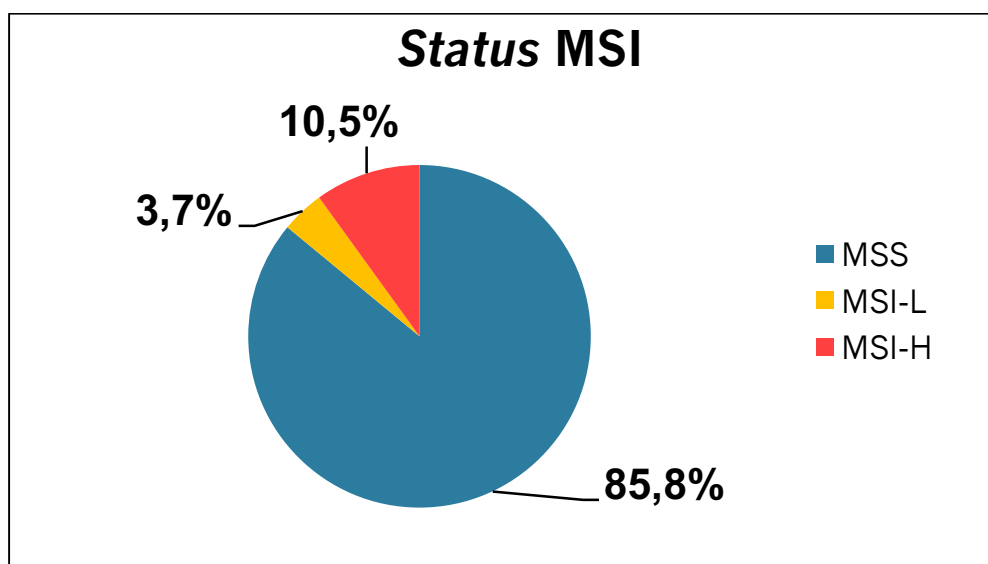


Figura 5 – Porcentagem do *status* de MSI para os 1013 casos de câncer colorretal analisados. MSS – estabilidade de microssatélite, MSI-L – baixa instabilidade de microssatélite e MSI-H – alta instabilidade de microssatélite.

Casos Suspeitos de Síndrome de Lynch – Encaminhamento para o Departamento de Oncogenética

Alguns critérios clínicos/patológicos são determinantes para a elegibilidade de um paciente como possível portador de Síndrome de Lynch. Atualmente, os *guidelines* mais adotados são: Amsterdam I, Amsterdam II e Bethesda (Quadro 1). Os dois primeiros baseiam-se principalmente na história familiar de câncer do paciente, e o terceiro, baseia-se

também em dados patológicos. A ficha de coleta de dados clínico-patológico do presente trabalho não possui informações da história familiar de câncer dos pacientes analisados. Sendo assim, apenas o *guideline* de Bethesda pode ser utilizado como um indicador de casos suspeitos de Síndrome de Lynch. Com isso, temos então: 291, 22 e 56 casos que se enquadram nos critérios 1, 2 e 3 do *guideline* Bethesda, respectivamente.

4.4 Imunoistoquímica das proteínas do *Mismatch Repair* (MMR)

Foram analisados 996 casos do total de 1013 quanto ao *status* das proteínas de reparo do *Mismatch Repair* (MMR) por meio de Imunoistoquímica (IHQ). A falta de material no bloco de parafina ou ainda a ausência do mesmo (por diversos fatores) junto ao Departamento de Patologia, impossibilitaram a obtenção de resultado em 17 casos.

Dos casos analisados, 88,9% (886/996) apresentaram todas as proteínas com sua expressão mantida (*status* da imunoistoquímica positivo) (Figura 6), 10,2% (102/996) com pelo menos a perda da expressão de uma das proteínas analisadas (*status* da imunoistoquímica negativo) e 0,9% (8/996) casos Inconclusivos devido à qualidade do material fixado.

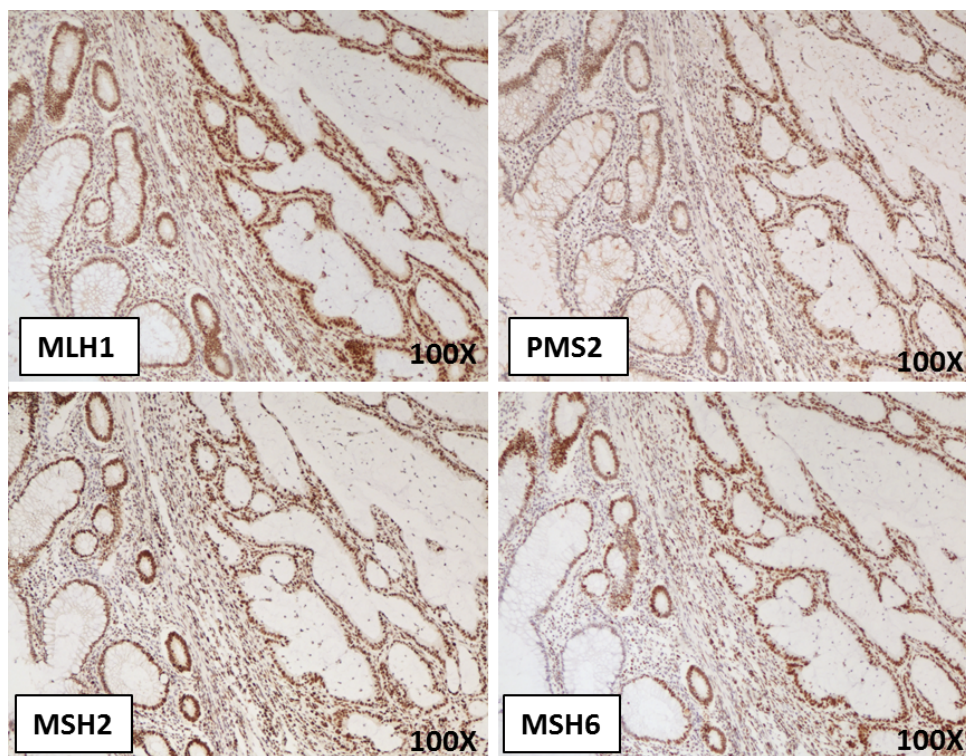


Figura 6 – Análise de imunoistoquímica, para todas as proteínas analisadas (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), marcação positiva. Fotografias capturadas em microscópio de luz.

Dos casos que apresentaram um status negativo para a análise das proteínas de reparo do *Mismatch Repair*, temos que: 52,0% (53/102) apresentaram perda de expressão proteica do par MLH1/PMS2 e 20,6% (21/102) perderam expressão do par MSH2/MSH6. Tivemos ainda: 1,9%, 2,9%, 7,9% e 6,9% de casos apresentando perda de somente MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, respectivamente (Tabela 4). Nenhum caso apresentou a perda de todas as 4 proteínas analisadas.

Tabela 4 – Número de casos apresentando proteínas de reparo do *Mismatch Repair* com *status* negativo.

Proteínas com <i>status</i> negativo	Número de casos (102)
MLH1 e PMS2	53
MSH2 e MSH6	21
MLH1	2
MSH2	3
MSH6	8
PMS2	7

4.5 Comparação entre *status* de MSI e de imunoistoquímica das proteínas do MMR

Na Tabela 5 temos os valores obtidos para cada *status* nas análises de imunoistoquímica e MSI e a análise de concordância (Teste Kappa) entre as metodologias.

Tabela 5 - Valores para as análises de imunoistoquímica e MSI e análise de concordância (Teste Kappa) entre as duas metodologias.

<i>Status</i> Imunoistoquímica (n)	<i>Status</i> MSI (n)	% concordância
Positivo (886)	MSS+MSI-L (882)	95,6 (p<0,001)
	MSI-H (4)	
Negativo (102)	MSS+MSI-L (4)	
	MSI-H (98)	

MSI-H: Alta instabilidade de microsatélite, MSS: estabilidade de microsatélite, MSI-L: baixa instabilidade de microsatélite, n: número de casos.

Tendo em vista que o resultado positivo da imunoistoquímica deva resultar em estabilidade de microsatélites e que um resultado negativo da imunoistoquímica deva resultar em instabilidade de microsatélites, podemos observar que a porcentagem de concordância (Teste Kappa) entre as duas técnicas foi elevada (95,6%) e que apresenta um $p<0,001$, comprovando estatisticamente que há concordância entre as duas técnicas (Tabela 5).

Utilizando-se a imunoistoquímica como teste referência (padrão-ouro) para determinar a instabilidade de microssatélites, os valores da análise de Sensibilidade, Especificidade e Acurácia do Teste MSI foram: 99,5%, 96,1% e 99,2%, respectivamente e os valores utilizados para essas análises constam na Tabela 6. Isso mostra que, além de apresentar uma elevada concordância com o teste de imunoistoquímica, o teste de MSI apresentou também uma alta sensibilidade, especificidade e acurácia na obtenção dos resultados.

Tabela 6 - Valores utilizados para análise de Sensibilidade, Especificidade e Acurácia do Teste de Instabilidade de Microssatélite (MSI).

	Expressão Negativa MMR (n)	Expressão Positiva MMR (n)	total
MSI-H	98	4	102
MSS+MSI-L	4	882	886
total	102	886	988

MSI-H: Alta instabilidade de microssatélite, MSS: estabilidade de microssatélite, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélite, n: número de casos.

No entanto, em oito casos, nós observamos discordância entre a imunoistoquímica e a análise molecular de MSI (Tabela 7). Nestes casos, nós realizamos uma análise de potenciais genes MSI-alvo com o intuito de observar outras regiões de microssatélites que podem sofrer influência de um fenótipo de MSI. Todos os casos que se apresentaram MSI-H e positividade na imunoistoquímica exibiram genes MSI-alvo com alteração, variando de 3 a 8 genes (Tabela 7). Nenhum dos casos que exibiram MSS e negativo para a imunoistoquímica apresentaram genes MSI-alvo com alteração (Tabela 7). Nos casos MSI-L, observaram-se genes MSI-alvo alterados (Tabela 7). Isto sugere que a análise molecular correlaciona melhor com o fenótipo MSI no CCR.

Tabela 7 – Resumo dos casos com dados discordantes entre imunoistoquímica e análise molecular de MSI. Genes MSI-alvo alterados comparados entre DNA de tecido normal e tumoral das amostras.

Amostra	Status Imunoistoquímica	MLH1	MSH2	MSH6	PMS2	Status MSI	Gene MSI-alvo mutado
11.0011	Negativo	+ (20)	+ (90)	+ (20)	-	MSS	nenhum
12.0767	Negativo	-	+ (100)	+ (40)	-	MSS	nenhum
11.0226	Negativo	+ (90)	+ (80)	-	+ (80)	MSI-L	<i>RAD50, BAX, MSH6, TGFBRII, EGFR</i>
13.0395	Negativo	+ (100)	+ (100)	+ (100)	-	MSI-L	<i>XRCC2, MBD4, TCF4, HSP110</i>
11.0404	Positivo	+ (90)	+ (60)	+ (50)	+ (70)	MSI-H	<i>TGFBRII, ROCK1, MRE11, GLYR1, ATM, EGFR, HSP110</i>
11.0827	Positivo	+ (70)	+ (60)	+ (5)	+ (100)	MSI-H	<i>TGFBRII, MSH3, MSH6, ROCK1, MRE11, ATM, EGFR, HSP110</i>
13.0578	Positivo	+ (80)	+ (90)	+ (80)	+ (100)	MSI-H	<i>MSH3, MRE11, ATM, EGFR, HSP110</i>
13.1023	Positivo	+ (100)	+ (80)	+ (80)	+ (100)	MSI-H	<i>ATM, EGFR, HSP110</i>

(+) com expressão proteica; (-) sem expressão proteica; MSI: instabilidade de microssatélite; MSI-H: Alta instabilidade de microssatélite, MSS: estabilidade de microssatélite, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélite. Entre os parênteses estão as porcentagens das células neoplásicas positivas para cada proteína.

4.6 Associação do *status* de MSI com os dados demográficos e clínico-patológicos

Para analisar as associações entre os *status* de MSI e os dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes, realizaram-se testes de Qui-quadrado ou Exato de Fisher (Tabela 8).

Após as análises, as variáveis que apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) foram: localização do tumor primário, estadiamento, linfonodos regionais, metástases, tipo histológico, grau histológico, tumor sincrônico, metástase ao diagnóstico, recorrência e status de sobrevivência.

Para essas variáveis, observamos que os casos que estão mais frequentemente associados ao *status* MSS+MSI-L apresentam: tumor primário localizado no cólon esquerdo/reto; estadiamento IV; metástases classificadas em M1b; tipo histológico adenocarcinoma; grau histológico I/II; ausência de tumor sincrônico; presença de metástase ao diagnóstico; presença de recorrência da doença e casos que estão vivos com a doença ou tiveram óbito por câncer (Tabela 8).

Os casos MSI-H estão mais frequentemente associados a: tumor primário localizado no cólon direito; estadiamento II; metástases classificadas em M0; tipo histológico mucinoso; grau histológico III/indiferenciado; presença de tumor sincrônico; ausência de metástase ao diagnóstico, não recorrência da doença e casos vivos sem doença (Tabela 8).

A Odds Ratio (OR) e seu respectivo Intervalo de Confiança (IC95%) descritos na Tabela 8 foram estimados descritivamente tendo como variável desfecho o *status* MSI (resposta: MSI-H) e as categorias de referência estão representadas pelo número 1.

Tabela 8 - Distribuição do *status* de MSI-H dentre os dados demográficos e clínico-patológicos.

Variável	Categoria	Status de MSI		p-valor	Odds Ratio (IC)
		MSS+MSI-L % (n)	MSI-H % (n)		
Sexo	Masculino	52,7 (478)a	47,2 (50)a	0,28	1
	Feminino	47,3 (429)a	52,8 (56)a		1,25 (0,83 - 1,87)
Idade ao diagnóstico	< 50 anos	28,9 (262)a	27,4 (29)a	0,10	1
	≥ 50 e < 75 anos	61,0 (553)a	55,7 (59)a		0,96 (0,60 – 1,54)
	≥ 75 anos	10,1 (92)a	17,0 (18)b		1,77 (0,94 – 3,33)
Localização do Tumor Primário	Cólon direito	20,0 (181)a	69,8 (74)b	<0,001	1
	Colón esquerdo/Reto alto	54,6 (495)a	22,6 (24)b		0,12 (0,07 - 0,19)
	Reto médio e baixo	25,4 (230)a	7,5 (8)b		0,09 (0,04 - 0,18)
Estadiamento	0 / I	13,2 (118)a	9,4 (10)a	0,002	1
	II	35,6 (319)a	50,0 (53)b		1,96 (0,97 – 3,98)
	III	30,9 (277)a	33,0 (35)a		1,49 (0,71 – 3,11)
	IV	20,3 (182)a	7,5 (8)b		0,52 (0,20 – 1,35)
Tumor primário	Tis/0	2,4 (21)a	0 (0)a	0,24	1
	T1	3,6 (31)a	1,0 (1)a		1,03 (0,97 - 1,10)
	T2	12,2 (106)a	11,4 (12)a		1,11 (1,05 - 1,18)
	T3	66,7 (581)a	68,6 (72)a		1,12 (1,09 - 1,115)
	T4	15,2 (132)a	19,0 (20)a		1,15 (1,08 - 1,22)

(continua na próxima página)

Tabela 8 (continuação) - Distribuição do *status* de MSI-H dentre os dados demográficos e clínico-patológicos.

Variável	Categoria	Status de MSI		p-valor	Odds Ratio (IC)
		MSS+MSI-L % (n)	MSI-H % (n)		
Linfonodos Regionais	N0	53,6 (464)a	61,9 (65)a	0,05	1
	N1 (1 a 3)	20,2 (175)a	22,9 (24)a		0,98 (0,59 - 1,61)
	N2 (≥ 4)	26,2 (227)a	15,2 (16)a		0,50 (0,28 - 0,89)
Metástases	M0	80,6 (723)a	91,4 (96)b	0,014	1
	M1a	12,4 (111)a	7,6 (8)a		0,54 (0,26 - 1,15)
	M1b	7,0 (63)a	1,0 (1)b		0,12 (0,02 - 0,87)
Tipo histológico	Adenocarcinoma	94,2 (854)a	86,8 (92)b	0,002	1
	Mucinoso	5,4 (49)a	10,4 (11)b		2,08 (1,05 - 4,15)
	Outros	0,4 (4)a	2,8 (3)b		6,96 (1,53 - 31,59)
Grau histológico	Grau I / II	95,3 (851)a	76,7 (79)b	<0,001	1
	Grau III / Indiferenciado	4,7 (42)a	23,3 (24)b		6,16 (3,54 - 10,69)
Invasão angiolinfática	Não	67,8 (561)a	66,0 (68)a	0,72	1
	Sim	32,2 (267)a	34,0 (35)a		1,08 (0,70 - 1,67)
Invasão perineural	Não	85,4 (654)a	87,6 (85)a	0,55	1
	Sim	14,6 (112)a	12,4 (12)a		0,82 (0,44 - 1,56)

(continua na próxima página)

Tabela 8 (continuação) - Distribuição do *status* de MSI-H dentre os dados demográficos e clínico-patológicos.

Variável	Categoria	Status de MSI		p-valor	Odds Ratio (IC)
		MSS+MSI-L % (n)	MSI-H% (n)		
Tumor sincrônico	Não	98,2 (888)a	94,3 (100)b	0,01	1
	Sim	1,8 (16)a	5,7 (6)b		3,33 (1,27 - 8,7)
Metástase ao diagnóstico	Não	79,5 (707)a	92,2 (95)b	0,002	1
	Sim	20,5 (182)a	7,8 (8)b		0,33 (0,16 - 0,69)
Recorrência	Não	70,3 (518)a	83,7 (82)b	0,006	1
	Sim	29,7 (219)a	16,3 (16)b		0,46 (0,26 – 0,81)
Status de sobrevivência	Vivo sem doença	55,0 (499)a	74,5 (79)b	<0,001	1
	Vivo com doença	10,7 (97)a	2,8 (3)b		0,19 (0,06 – 0,63)
	Óbito por câncer	27,8 (252)a	13,2 (14)b		0,35 (0,19 – 0,63)
	Óbito por outras causas	4,7 (43)a	5,7 (6)a		0,88 (0,36 – 2,14)
	Perda de seguimento	1,8 (16)a	3,8 (4)a		1,58 (0,51 – 4,84)

MSI-H: Alta instabilidade de microssatélite. MSS: estabilidade de microssatélite. MSI-L: baixa instabilidade de microssatélite. n: número de casos. a,b: Letras diferentes demonstram uma diferença estatisticamente significativa após as comparações múltiplas com a correção do nível de significância pelo método de Bonferroni.

4.7 Mutação em *BRAF* (V600E) e Metilação de *MLH1* em casos MSI-H

Para todos os 106 casos determinados como MSI-H, avaliamos a presença de mutação no gene *BRAF* (V600E) (Figura 7). Observa-se que 73,6% (78/106) não apresentam mutação e, por conseguinte, 26,4% (28/106) dos casos apresentam mutação *BRAF* (V600E) (Figura 8).

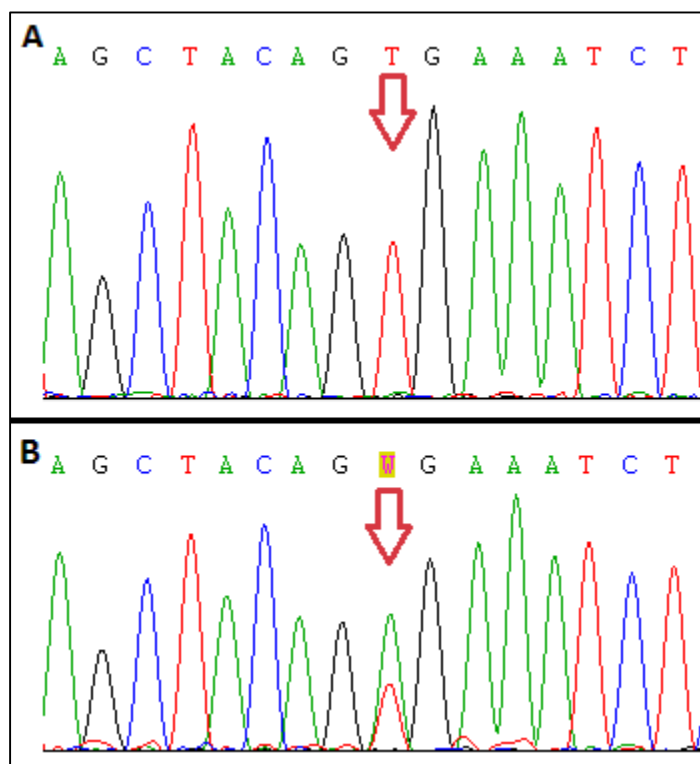


Figura 7 – Eletroferograma de sequência do gene *BRAF* (éxon 15), em destaque o códon 600. A: sequência selvagem. B: sequência mutada (V600E).

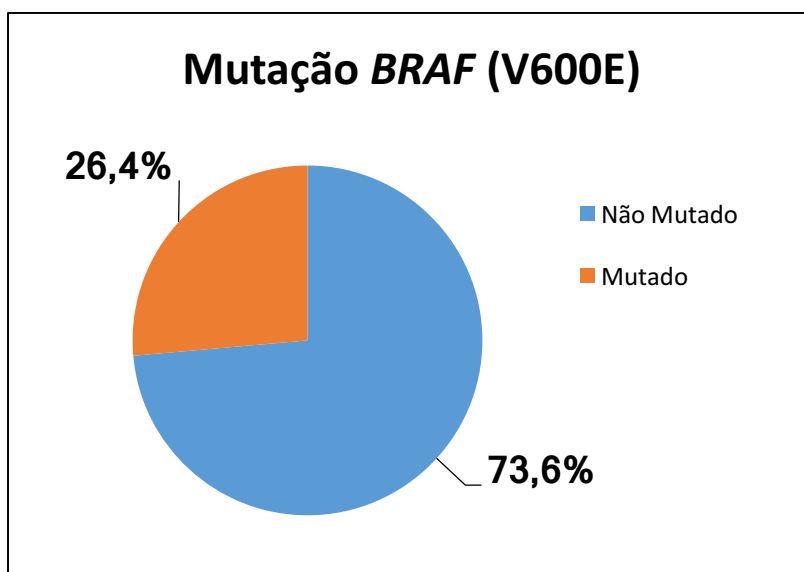


Figura 8 - Porcentagem do status de muta  o do gene *BRAF* (V600E) para os 106 casos MSI-H avaliados.

Dentre os 106 casos MSI-H, a metila  o da região promotora do gene *MLH1* foi avaliada em 65 casos, que já apresentavam perda da expressão da proteína MLH1 (Figura 9). Dentre esses casos, observou-se metila  o em 72,3% (47/65) dos casos, não metila  o em 26,1% (17/65) e em apenas 1,6% (1/65) dos casos não foi possível obter resultado (Figura 10).

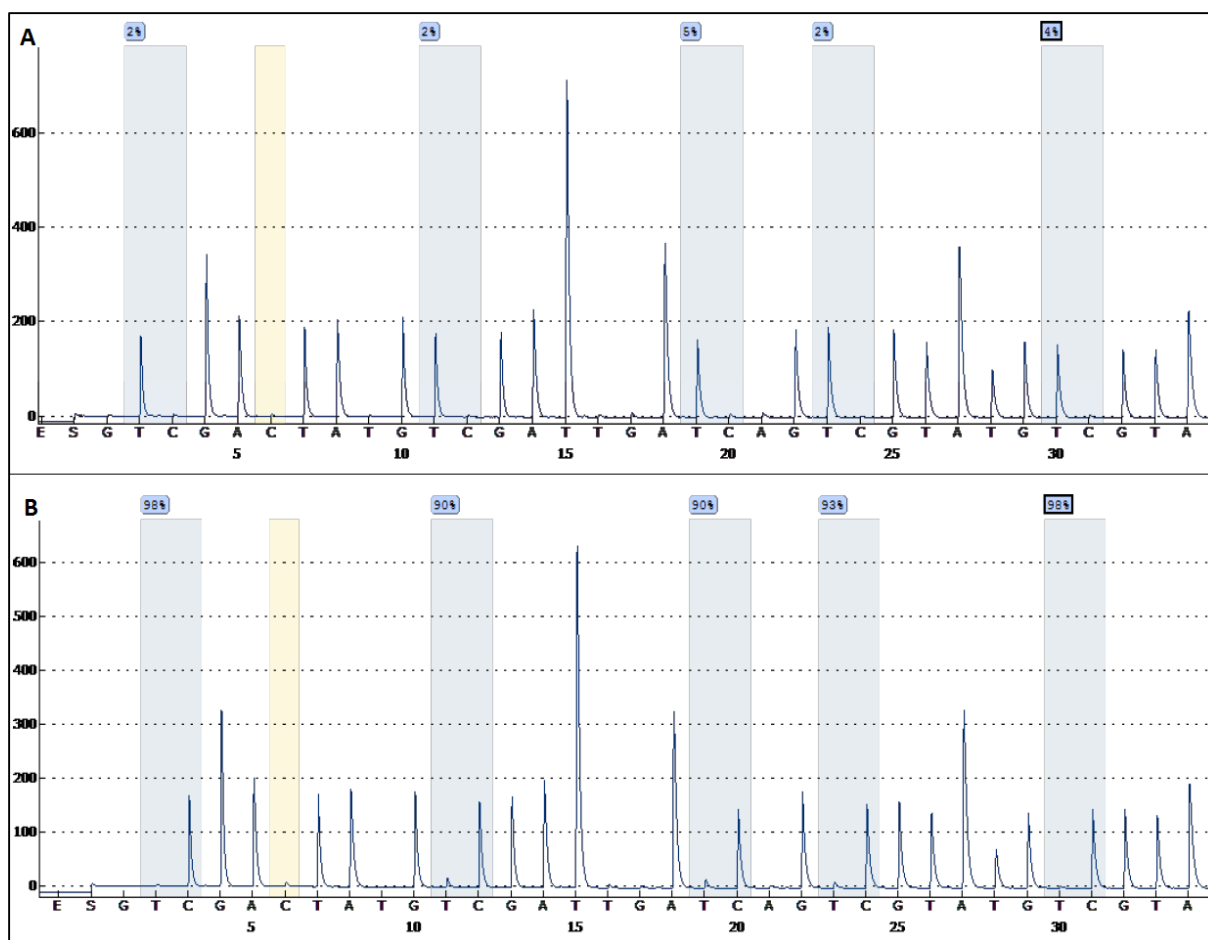


Figura 9 – Pirograma da sequência da região promotora do gene *MLH1* analisada para detecção de metilação. Os quadros sombreados em azul-claro destacam as cinco ilhas CpG analisadas nessa sequência. O quadro sombreado em amarelo-claro destaca o controle para a qualidade da conversão bissulfeto. A: perfil de amostra não metilada. B: perfil de amostra metilada.

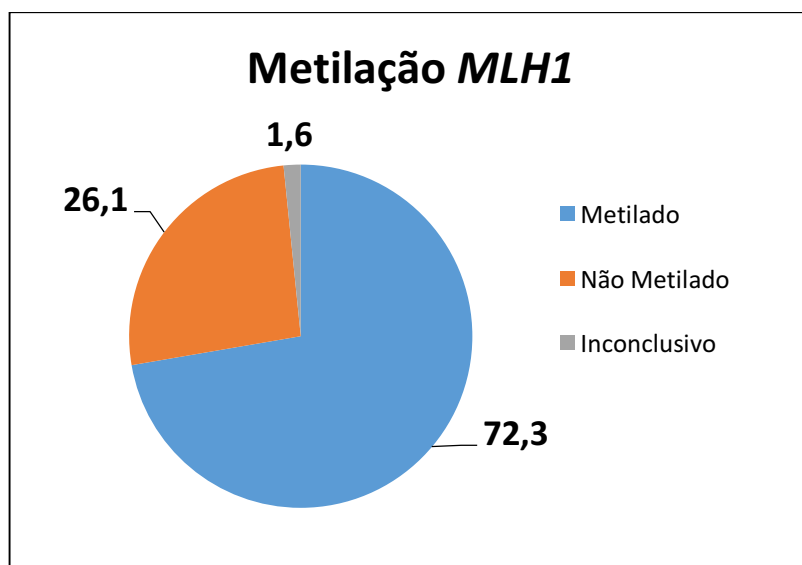


Figura 10 - Porcentagem do status de metilação da região promotora do gene *MLH1* para 65 casos MSI-H, que apresentavam perda da expressão da proteína *MLH1*.

4.8 Estudo de potenciais genes MSI-alvo

Todos os 106 casos MSI-H foram analisados quanto ao *status* dos genes MSI-alvo. Para essa análise, foram considerados casos alterados aqueles que apresentaram expansão ou contração das regiões de microssatélite analisadas para cada gene MSI-alvo (Figura 11). Estas análises foram realizadas de modo pareado com o tecido normal adjacente de cada caso. Na Tabela 9 temos as porcentagens para cada gene. Na Figura 12 temos a representação da porcentagem de alteração de cada gene MSI-alvo para as funções gênicas relacionadas a eles. Podemos observar que os genes *BRCA1*, *BRCA2*, *XPO5* e *XRCC2* não apresentaram nenhum caso alterado.

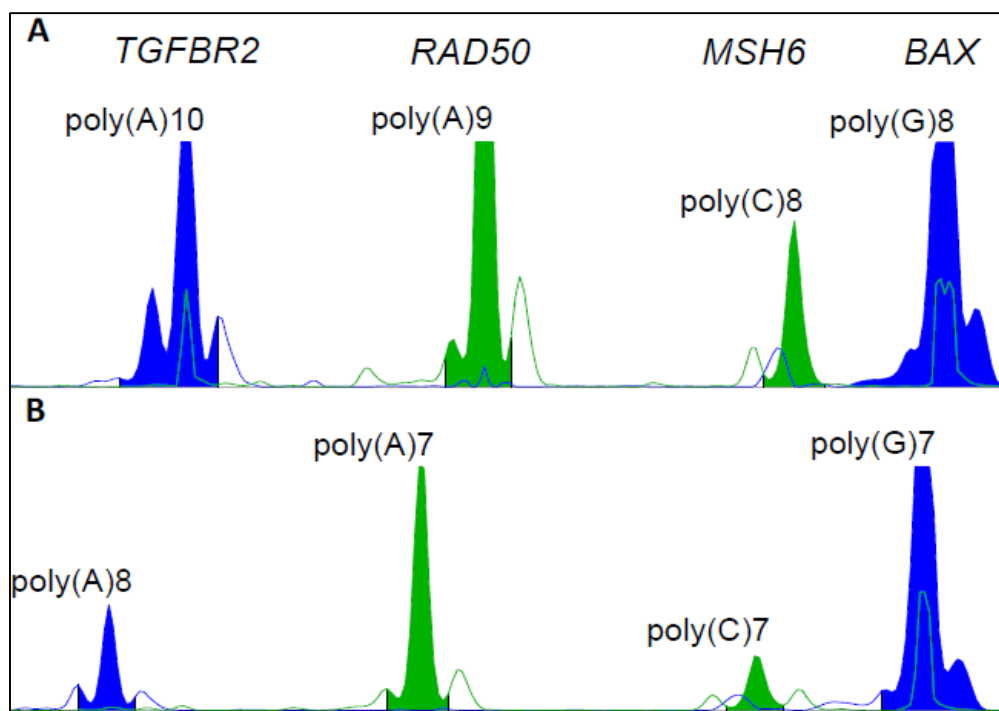


Figura 11 – Análise de genes MSI-alvo. Representação gráfica da análise de fragmento de quatro genes MSI-alvo. A: amostra de DNA de tecido normal apresentando tamanho selvagem para cada gene analisado. B: amostra de DNA de tecido tumoral apresentando tamanho alterado para cada gene analisado, devido a expansão/contração das regiões de microsatélites analisadas.

Tabela 9 - Porcentagem de casos alterados (expansão ou contração da região de microssatélite analisada) e região gênica do microssatélite para cada gene MSI-alvo analisado nas amostras MSI-H.

gene MSI-alvo	região gênica do microssatélite (versão genoma humano: hg19)	% casos alterados
<i>HSP110</i>	não codificante (íntron 8)	92,9
<i>ATM</i>	não codificante (íntron 5)	82,3
<i>EGFR</i>	não codificante (3'UTR)	79,0
<i>MRE11</i>	não codificante (íntron 4)	77,7
<i>ROCK1</i>	não codificante (íntron 31)	60,0
<i>TGFBR1</i>	codificante (éxon 4)	58,1
<i>MSH3</i>	codificante (éxon 7)	21,4
<i>TCF4</i>	codificante (éxon 14)	19,2
<i>GLYR1</i>	codificante (éxon 13)	17,0
<i>DNAPKc</i>	codificante (éxon 5)	15,5
<i>MBD4</i>	codificante (éxon 3)	14,4
<i>ATR</i>	codificante (éxon 10)	12,4
<i>BAX</i>	codificante (éxon 3)	10,5
<i>RAD50</i>	codificante (éxon 13)	8,6
<i>MSH6</i>	codificante (éxon 5)	5,7
<i>ABCC5</i>	codificante (éxon 22)	5,1
<i>PTEN*</i>	codificante (éxon 7) não codificante (íntron 8)	3,0
<i>BLM</i>	codificante (éxon 7)	3,0
<i>WISP3</i>	codificante (éxon 4)	1,9
<i>TRBP2</i>	codificante (éxon 5)	1,0
<i>BRCA1</i>	codificante (éxon 10)	zero
<i>BRCA2</i>	codificante (éxon 10)	zero
<i>XPO5</i>	codificante (éxon 32)	zero
<i>XRCC2</i>	codificante (éxon 3)	zero

* dois microssatélites analisados.

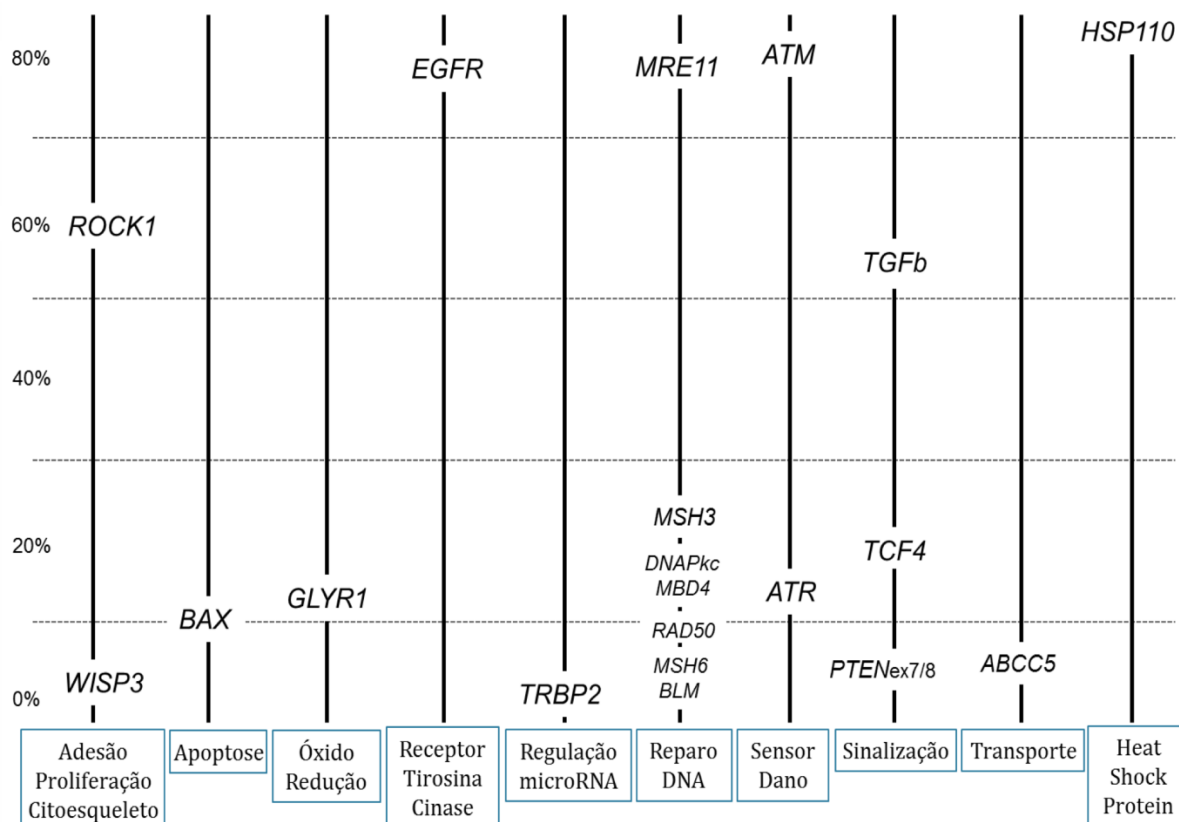


Figura 12 - Porcentagem de casos alterados (expansão ou contração da região de microssatélite analisada) para cada gene MSI-alvo de acordo com a função gênica desempenhada nos casos MSI-H.

4.9 Determinação da proporção de ancestralidade

Foi determinada a proporção de ancestralidade de 945 pacientes dos 1013 incluídos no estudo. Os resultados obtidos pelo painel de marcadores *AIMs* (*Ancestry-informative Markers*) nos permitiu estimar as proporções de ancestralidade Africana (AFR), Europeia (EUR), Asiática (ASN) e Ameríndia (AME) (Figura 13). Na Tabela 10 temos os valores médios (em porcentagem) da proporção dos componentes de ancestralidade para cada grupo analisado baseado no *status* MSI, além do grupo CCR Brasil que é composto por toda a casuística.

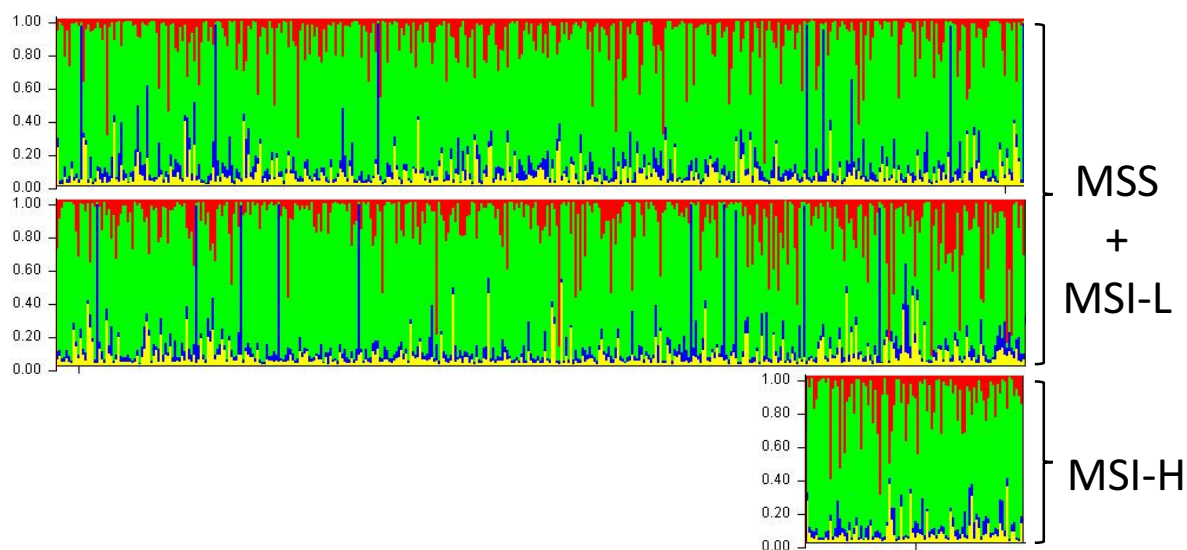


Figura 13 - Representação gráfica da estimativa da ancestralidade de cada caso dos grupos analisados (MSS+MSI-L e MSI-H) usando os dados genéticos do painel de diversidade HGDP-CEPH como referências. A proporção de ancestralidade (porcentagem) está representada em cores: Vermelha – Africana; Verde – Europeia; Azul – Asiática; Amarela – Ameríndia.

Tabela 10 - Valores médios da proporção de ancestralidade para cada grupo analisado.

Grupos	n	AFR (%)	EUR (%)	ASN (%)	AME (%)
CCR Brasil	945	12,6	73,9	6,8	6,7
MSS + MSI-L	845	12,4	73,8	7,1	6,7
MSI-H	100	14,2	74,3	5,0	6,5

AFR: Africana, EUR: Europeia, ASN: Asiática, AME: Ameríndia, CCR: câncer colorretal, MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites, n: número de casos.

Posteriormente, analisamos a correlação entre as distintas ancestralidades (Figura 14 e Tabela 11). Como podemos observar, alguns componentes de ancestralidade estão correlacionados, tais como: Africana com Europeia (-0,73; $p < 0,001$), Europeia com Asiática (-0,56; $p < 0,001$) e Europeia com Ameríndia (-0,38; $p < 0,001$).

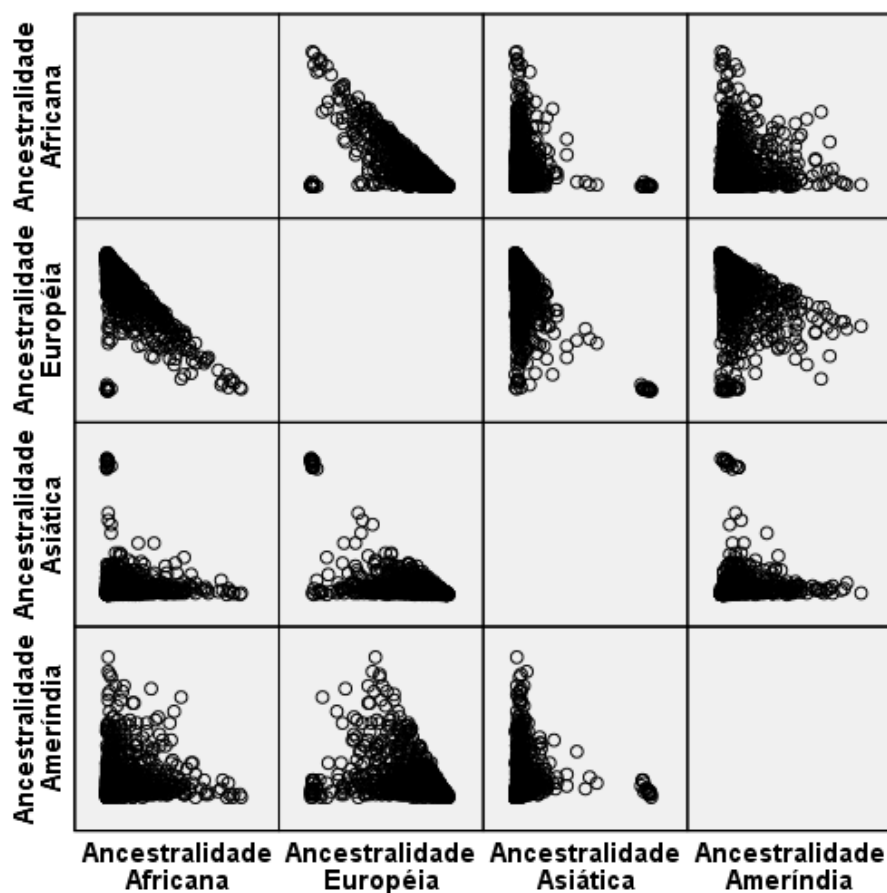


Figura 14 – Gráfico de dispersão entre os componentes de ancestralidade, obtido pelo software SPSS. Observa-se graficamente a correlação linear entre as ancestralidades.

Tabela 11 – Correlação linear de Pearson entre as ancestralidades.

		AFR	EUR	ASN	AME
AFR	Correlação de Pearson	1	-0,725	-0,057	0,045
	p-valor		<0,001	0,081	0,167
EUR	Correlação de Pearson		1	-0,558	-0,375
	p-valor			<0,001	<0,001
ASN	Correlação de Pearson			1	0,007
	p-valor				0,823

AFR: Africana, EUR: Europeia, ASN: Asiática, AME: Ameríndia.

As referidas correlações apresentadas são fatores limitantes para o ajuste de um modelo de regressão múltiplo dado o antecipado conhecimento da relação entre as variáveis a serem utilizadas como explicativas. Com o intuito de ajustar o modelo sem a

correlação entre as variáveis, optamos por trabalhar com componentes principais (CP), que é uma combinação linear das variáveis originais, para a ancestralidade. A análise de CP tem a finalidade de substituir um conjunto de variáveis correlacionadas por um conjunto de novas variáveis não correlacionadas, sendo essas combinações lineares das variáveis iniciais, e colocadas em ordem decrescente por suas variâncias, $VAR\ CP1 > VAR\ CP2 > \dots > VAR\ CPp$ ¹⁰⁸.

No contexto deste trabalho o intuito do uso dos componentes principais é eliminar a correlação entre as ancestralidades a fim de evitar a multicolinearidade que poderia comprometer o ajuste do modelo. Os componentes principais foram calculados utilizando a matriz de correlação amostral da tabela de dados contida pelas quatro ancestralidades de todos os pacientes (945x4) e a proporção da variabilidade dos dados explicada pelos três primeiros componentes principais consta na Tabela 12.

Tabela 12 – Proporção da variabilidade dos dados explicada por cada componente principal.

	CP1	CP2	CP3	CP4
Proporção da variância	0,50	0,26	0,23	0,01
Proporção acumulada	0,50	0,76	0,99	1

CP: componente principal.

O primeiro componente principal responde por cerca de 50% da variância total dos dados, ao passo que se tomarmos os três primeiros CP atingimos 99% da variância total. Levando em consideração os três primeiros componentes principais, pois explicam 99% da variabilidade dos dados, temos os seus coeficientes descritos na Tabela 13, ou seja, os autovetores da matriz de correlação amostral.

Tabela 13 – Coeficientes (autovetores) da matriz de correlação amostral.

	CP1	CP2	CP3
Africana	0,52	-0,55	0,39
Europeia	-0,71	-0,03	-0,04
Asiática	0,38	0,82	0,11
Ameríndia	0,30	-0,14	-0,91

CP: componente principal.

Por meio dos coeficientes dos CP, calculamos os *Scores* para cada um dos componentes principais que oportunamente foram utilizados na análise de regressão logística múltipla como covariáveis, pois estes, pela natureza de sua construção não são correlacionados, mas contém as informações de cada paciente acerca de cada uma das ancestralidades. A Tabela 14 apresenta uma pequena parcela dos referidos *Scores*.

Tabela 14 - *Scores* para cada um dos componentes principais.

Amostra	Score 1	Score 2	Score 3
1	-1,06328	0,08958	-0,22690
2	-0,69842	0,25992	0,09213
3	-0,65538	0,11417	-0,10859
4	-0,80568	-0,01224	-0,37273
5	-0,87430	0,26554	-0,12988
.	.	.	.
.	.	.	.
944	-0,99209	0,05791	-0,25650
945	0,02768	0,98304	0,34905

De acordo com a Figura 15 e do coeficiente de correlação de Pearson (Tabela 15) podemos observar como cada uma das ancestralidades se relaciona com cada um dos *Scores*, nos remetendo à importância de cada uma no cálculo do *Score*.

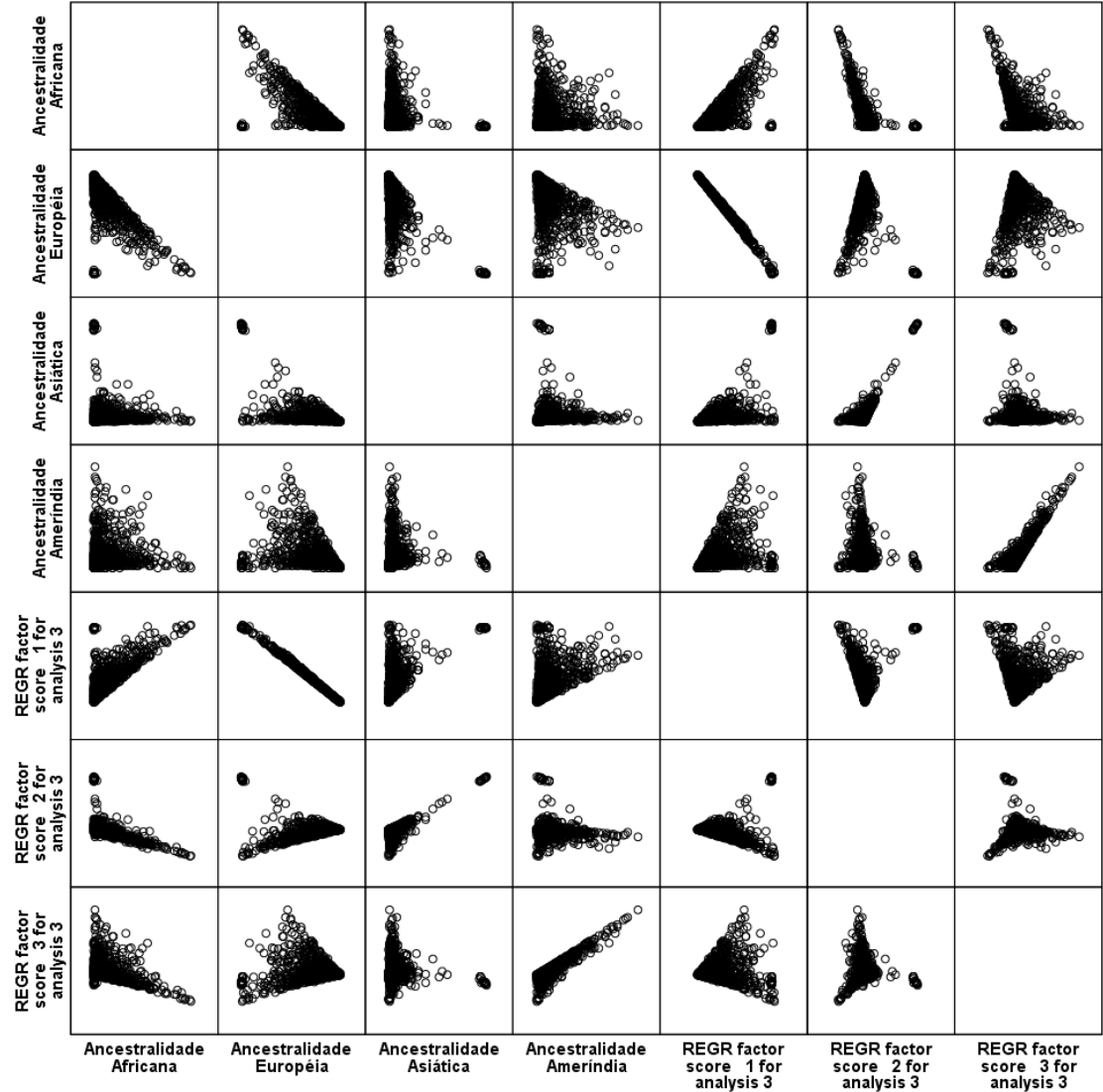


Figura 15 - Gráfico de dispersão entre os componentes de ancestralidade e os *Scores*, obtido pelo *software* SPSS.

Tabela 15 - Coeficiente de correlação de Pearson para as ancestralidades e os *Scores* analisados.

Ancestralidade		Score 1	Score 2	Score 3
AFR	Coeficiente de Pearson	0,73	-0,57	-0,38
	p-valor	< 0,001	< 0,001	< 0,001
EUR	Coeficiente de Pearson	-0,99	-0,03	0,04
	p-valor	< 0,001	0,356	0,181
ASN	Coeficiente de Pearson	0,53	0,84	-0,10
	p-valor	< 0,001	< 0,001	0,002
AME	Coeficiente de Pearson	0,42	-0,14	0,89
	p-valor	< 0,001	< 0,001	< 0,001

AFR: Africana, EUR: Europeia, ASN: Asiática, AME: Ameríndia.

Com as informações contidas na Figura 15 e Tabela 15, temos:

1. Ancestralidade Africana se correlaciona positivamente com o *Score 1* e negativamente com o *Score 2* e *Score 3*,
2. Ancestralidade Europeia tem uma correlação negativa perfeita com o *Score 1* e não se correlaciona com o *Score 2* e *Score 3*
3. Ancestralidade Asiática tem uma correlação positiva com o *Score 1* e *Score 2* e não se correlaciona com o *Score 3* e finalmente,
4. Ancestralidade Ameríndia se correlaciona positivamente com o *Score 1* e 3.

Essas informações são importantes para fazermos inferências sobre as ancestralidades, por meio de suas relações com os *Scores*, no modelo de regressão logística.

A fim de verificar a possível relação dos três *Scores* com a variável resposta *status* MSI, realizamos o Teste de Man-Whitney conforme consta na Tabela 16. Podemos observar que não houve relação entre o *status* MSI e as ancestralidades analisadas.

Tabela 16 – Análise univariada para verificar a relação entre o *status* MSI e os *Scores* dos Componentes Principais.

Score	status MSI												p-valor
	MSS+MSI-L						MSI-H						
	n	média	DP	mediana	Min	Max	n	média	DP	mediana	Min	Max	
1	845	0,01	0,99	-0,32	-1,12	3,35	100	-0,01	1,01	-0,29	-1,12	3,37	0,96
2	845	0,02	1,03	0,05	-2,98	6,25	100	-0,19	0,69	-0,01	-2,93	1,34	0,16
3	845	0,01	1,00	-0,21	-2,78	5,93	100	-0,12	0,96	-0,26	-2,95	3,36	0,16

MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. n: número de casos. DP: desvio-padrão. Min: valor mínimo. Max: valor máximo.

Considerando um nível de significância de 0,2 para selecionar as variáveis que irão compor o modelo, temos que os *Scores* 2 e 3 se encaixam nesse critério. Ainda pela Tabela 16, notamos que a mediana dos *Scores* 2 e 3 são maiores para MSS+MSI-L.

4.10 Análise Multivariada para *status* de MSI

A análise multivariada foi realizada com todas as variáveis que apresentaram um p-valor <0,2, obtido após análise univariada com *status* de MSI como desfecho. As variáveis que iniciaram a modelagem foram: idade ao diagnóstico, localização do tumor primário, estágio ao diagnóstico, linfonodos regionais, tipo histológico, grau histológico, tumor sincrônico, metástase ao diagnóstico, recorrência, *status* de sobrevivência, número linfonodos ressecados, radioterapia, *Score* 2 e *Score* 3.

A modelagem iniciou-se com todas as variáveis e essas foram retiradas do modelo uma a uma, de acordo com a menor significância, até ajustar o modelo final com todas as variáveis com $p < 0,05$. Na Tabela 17 temos as variáveis que compõe o modelo e as estimativas de Odds Ratio para *status* de MSI.

De acordo com o modelo ajustado (Tabela 17), podemos observar que: casos cuja localização do tumor primário seja no cólon esquerdo/reto apresentam uma redução de aproximadamente 90% na chance de serem MSI-H comparados com os casos cuja localização é no cólon direito; casos apresentando grau histológico III/indiferenciado possuem seis vezes mais chance de serem MSI-H comparados com aqueles cujo grau histológico é I/II; casos que estão vivos com doença apresentam uma redução de

aproximadamente 90% na chance de serem MSI-H comparados com os casos vivos sem doença e os que foram mortos por câncer possuem uma chance reduzida de 75% de serem MSI-H comparados com os casos vivos e sem doença.

Ainda podemos observar para esse modelo ajustado (Tabela 17), que para o *Score 2* (correlacionado positivamente com a ancestralidade asiática e negativamente com a africana) temos uma redução de 33% na chance de serem MSI-H com o aumento de uma unidade no *Score*, ou seja, o aumento do *Score* está relacionado com a redução na chance do indivíduo ser MSI-H. Levando em consideração a relação existente entre o referido *Score 2* com as ancestralidades asiática e africana (Tabela 15), podemos inferir indiretamente que o aumento na proporção de ancestralidade asiática está relacionada com a redução na chance de ser MSI-H e o aumento na ancestralidade africana com o aumento da chance de ser MSI-H. Levando em consideração a baixa correlação entre as ancestralidades europeia e ameríndia com o *Score 2* (-0,03 e 0,14, respectivamente) (Tabela 15), podemos inferir indiretamente que as referidas ancestralidades não influenciam significativamente no *status* MSI.

Tabela 17 – Estimativa de Odds Ratio (OR) pelo Modelo de Regressão Logística Múltiplo para *status* MSI-H.

Variável	Categoria	n casos	n eventos	OR	IC 95%		p-valor
					inferior	superior	
Localização do tumor primário	Cólon direito	238	68	1	-	-	
	Cólon esquerdo / Reto alto	471	22	0,13	0,07	0,22	<0,001
	Cólon esquerdo / Reto médio e baixo	218	7	0,10	0,04	0,22	<0,001
Grau histológico	Grau I/II	866	75	1	-	-	
	Grau III/Indiferenciado	61	22	6,42	3,18	12,95	<0,001
Status de sobrevivência	Vivo sem doença	512	72	1	-	-	
	Vivo com doença	91	2	0,14	0,03	0,59	0,008
	Óbito por câncer	164	10	0,25	0,12	0,53	<0,001
	Óbito por outras causas	48	6	0,87	0,33	2,30	0,78
	Perda de Seguimento	112	7	2,27	0,61	8,48	0,22
Score 2	-	927	97	0,67	0,48	0,94	0,02

n: número, IC: intervalo de confiança.

4.11 Análises de Sobrevivência Global

Foram geradas tabelas de estimativa de sobrevivência global (SG) e gráficos de curvas de Kaplan-Meier por meio do *software* SPSS (versão 21). As tabelas contêm o número de casos (N casos) analisados para cada categoria das variáveis em questão, assim como, o número de eventos observados (N eventos), sendo o óbito (por qualquer motivo) do paciente, o evento. Ainda nelas, temos a probabilidade de sobrevivência (%) estimada para 1, 3 e 5 anos, além do p-valor, para as comparações entre as categorias das variáveis, obtido pelo teste de Long Rank.

De modo geral, para nossa casuística, temos uma probabilidade de sobrevivência para os pacientes CCR estimada para 1 ano de aproximadamente 93%, para 3 anos de 72% e para 5 anos de 49,4% (Tabela 18) (Figura 16). Temos ainda, que a sobrevivência global mediana foi calculada em 56 meses (IC95%: 47 – 65) e o tempo médio de seguimento dos casos foi de 31 meses (desvio-padrão de 20 meses).

Quando estratificamos os casos para o *status* MSI (MSS+MSI-L e MSI-H), não observamos diferença estatisticamente significativa entre as duas curvas (Figura 17). Ainda assim, os dados apontam uma probabilidade para 1 ano de 92,8% nos casos MSS+MSI-L e de 91,7% nos casos MSI-H; para 3 anos de 82,7% para ambos os *status* e para 5 anos de aproximadamente 49% para MSS+MSI-L e de 62,8% para MSI-H (Tabela 18).

Tabela 18 – Estimativa da Sobrevivência Global dos casos de CCR e estimativa da Sobrevivência Global estratificada para *status* MSI, pelo método Kaplan-Meier.

Variável	Categoria	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*
				1 ano	3 anos	5 anos	
-	-	989	312	92,7	72,0	49,4	-
<i>status</i> MSI	MSS+MSI-L	887	292	92,8	82,7	48,6	0,36
	MSI-H	102	20	91,7	82,7	62,8	

MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. n: número de casos. * teste Log Rank.

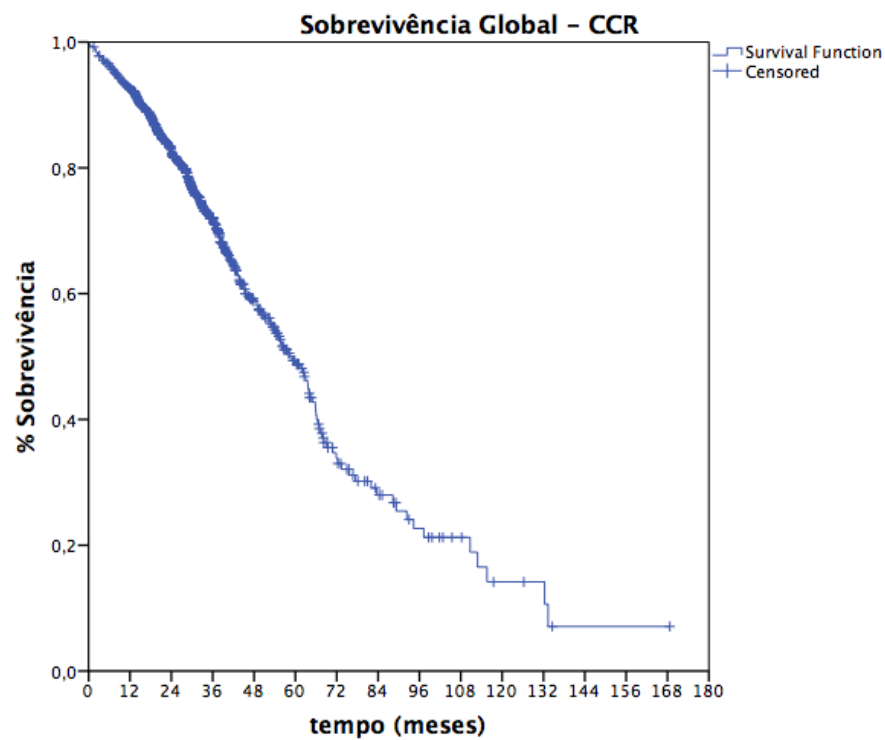


Figura 16 – Estimativa da Sobrevivência Global (SG) dos casos de CCR pelo método Kaplan-Meier.

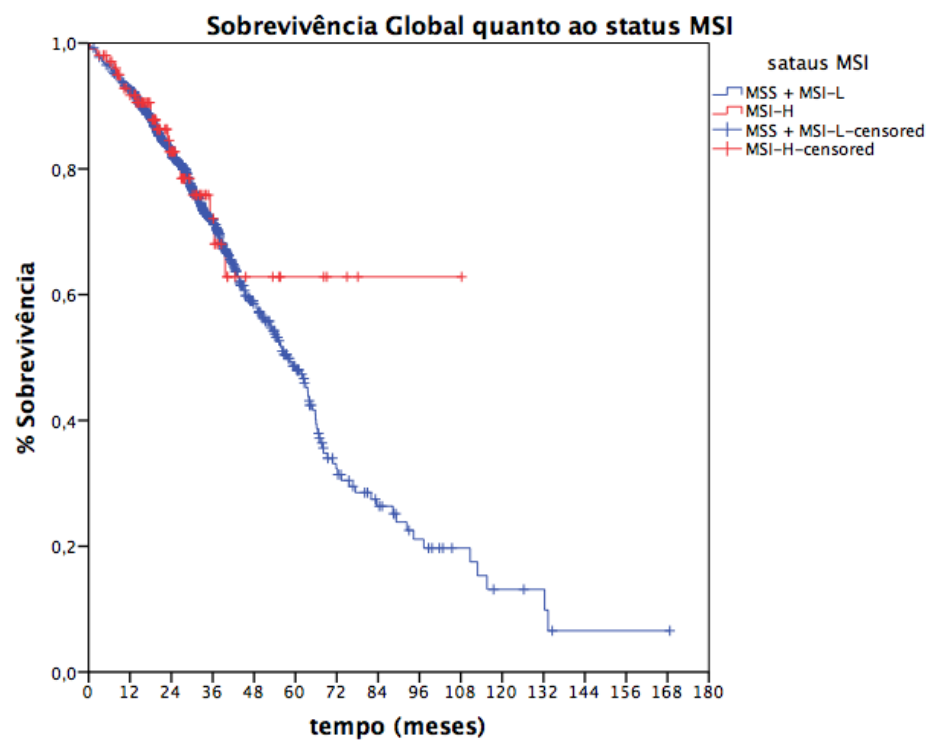


Figura 17 – Estimativa da Sobrevivência dos casos de CCR quanto ao *status* MSI pelo método Kaplan-Meier.

Além disso, analisamos também estratificando os casos quanto ao *status* MSI e a função gênica desempenhada pelo gene MSI-alvo alterado nos casos MSI-H. Nestas análises, todos os casos MSS+MSI-L não apresentavam qualquer um dos genes MSI-alvo alterados. Quanto a função gênica, os genes MSI-alvo foram assim separados: Reparo de DNA (*XRCC2*, *MBD4*, *MRE11*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50*, *DNAPkc*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BLM*, *ATM*, *ATR*), Apoptose (*BAX*), Sinalização celular (*PTEN*, *TCF4*, *TGFBRII*), Receptor de Tirosina Cinase (*EGFR*), Regulação microRNA (*TRBP2*, *XPO5*), Heat Shock Protein (*HSP110*), Óxido-redução (*GLYR1*), Adesão/Citoesqueleto (*WISP3*, *ROCK1*) e Transporte (*XPO5*, *ABCC5*). Para essas análises, foram considerados casos alterados, aqueles que apresentaram alteração em pelo menos um dos genes MSI-alvo que compõem cada função gênica. Assim, observa-se diferença estatisticamente significativa (Tabela 19) entre as curvas de sobrevivência para as funções gênicas: Sinalização celular, Receptor tirosina cinase e Adesão/Citoesqueleto. Detalhadamente, os casos MSI-H com genes MSI-alvo alterados ligados a essas funções gênicas apresentaram uma menor probabilidade de sobrevivência para 1 e 3 anos, mas uma maior probabilidade para 5 anos quando comparados com os casos MSS+MSI-L (Tabela 19).

Tabela 19 – Estimativa da Sobrevivência Global (SG) pelo método Kaplan-Meier para cada função gênica dos genes MSI-alvo estratificada pelo *status* MSI.

status MSI	Função gênica	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*
				1 ano	3 anos	5 anos	
MSS+MSI-L	Reparo DNA	887	292	92,8	72,0	48,6	0,90
MSI-H		98	19	92,4	72,1	62,2	
MSS+MSI-L	Apoptose	887	292	92,8	72,0	48,6	>0,99
MSI-H		10	3	78,8	63,0	63,0	
MSS+MSI-L	Sinalização celular	887	292	92,8	72,0	48,6	0,01
MSI-H		66	16	90,4	62,7	55,7	
MSS+MSI-L	Receptor Tirosina Cinase	887	292	92,8	72,0	48,6	0,04
MSI-H		75	17	90,1	70,7	58,0	
MSS+MSI-L	Regulação microRNA	887	292	92,8	72,0	48,6	0,38
MSI-H		1	0	100	100	100	
MSS+MSI-L	<i>Heat Shock Protein</i>	887	292	92,8	72,0	48,6	0,83
MSI-H		87	19	91,4	68,3	57,4	
MSS+MSI-L	Óxido-redução	887	292	92,8	72,0	48,6	0,68
MSI-H		16	4	80,8	64,6	64,6	
MSS+MSI-L	Adesão/Citoesqueleto	887	292	92,8	72,0	48,6	0,03
MSI-H		55	13	88,6	69,7	61,0	
MSS+MSI-L	Transporte	887	292	92,8	72,0	48,6	0,26
MSI-H		5	1	100	66,7	66,7	

MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. n: número de casos. Reparo de DNA (*XRCC2*, *MBD4*, *MRE11*, *MSH3*, *MSH6*, *RAD50*, *DNAPKc*, *BRCA1*, *BRCA2*, *BLM*, *ATM*, *ATR*), Apoptose (*BAX*), Sinalização celular (*PTEN*, *TCF4*, *TGFBR1*), Receptor de Tirosina Cinase (*EGFR*), Regulação microRNA (*TRBP2*, *XPO5*), *Heat Shock Protein* (*HSP110*), Óxido-redução (*GLYR1*), Adesão/Citoesqueleto (*WISP3*, *ROCK1*) e Transporte (*XPO5*, *ABCC5*). * teste Log Rank.

4.11.1 Análise de sobrevivência global estratificada quanto ao *status* MSI

Foram realizadas análises de sobrevivência estratificando a casuística total em relação ao *status* de MSI e então, comparando determinadas variáveis (localização tumor primário, idade ao diagnóstico, estadiamento, tipo histológico, grau histológico, *Score 2*, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia) quanto a possíveis diferenças entre as curvas de sobrevivência em ambos os *status*.

Os casos MSS+MSI-L não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas análises referentes: localização do tumor primário, *Score 2* e Tratamento Radioterapia (Tabela 20). A variável Tratamento Radioterapia foi gerada englobando os pacientes que passaram por radioterapia neoadjuvante, adjuvante e paliativa, e categorizada em Sim (recebeu tratamento radioterápico) e Não (não recebeu tratamento radioterápico).

Já, para a variável idade ao diagnóstico, observamos diferença estatisticamente significativa ($p=0,02$) onde os casos com <50 anos possuem uma maior (95,3%) probabilidade de sobrevivência em 1 ano, estes mesmos casos apresentam também uma maior (75%) probabilidade em 3 anos e os com ≥ 75 anos possuem uma maior (63,7%) probabilidade de sobrevivência em 5 anos (Tabela 20) (Figura 18).

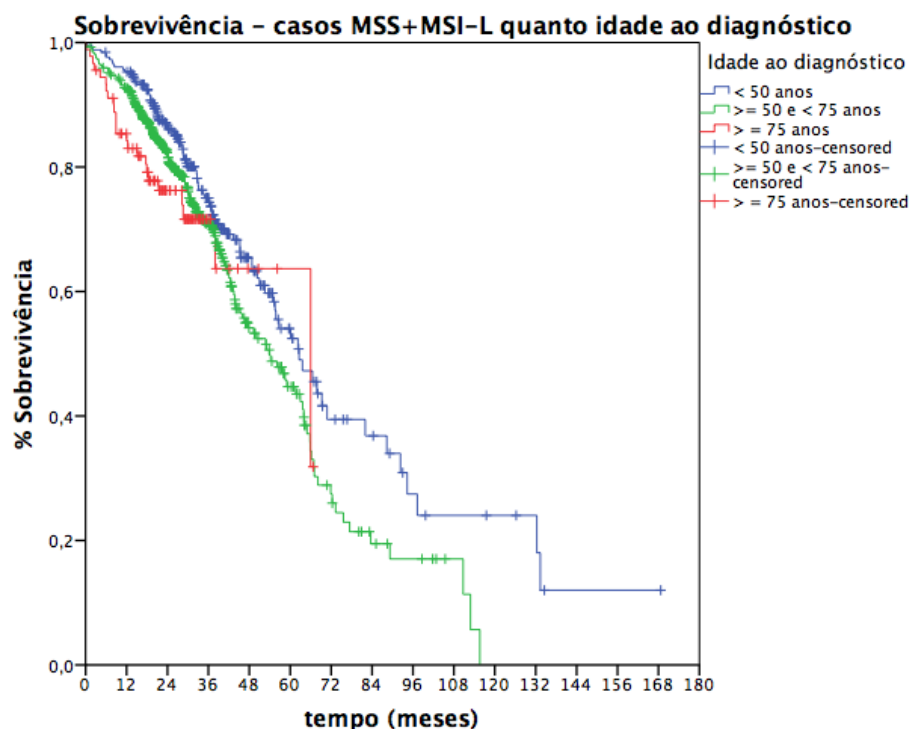


Figura 18 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto a idade ao diagnóstico pelo método Kaplan-Meier.

Ao analisarmos o estadiamento em 4 categorias, nos casos MSS+MSI-L, obtém-se diferença estatisticamente significativa ($p<0,001$), sendo que os casos estadio II possuem uma maior probabilidade (96,5%) de sobrevivência em 1 ano, enquanto que a categoria 0/I apresenta uma maior probabilidade de sobrevivência tanto em 3 quanto em 5 anos (Tabela 20) (Figura 19).

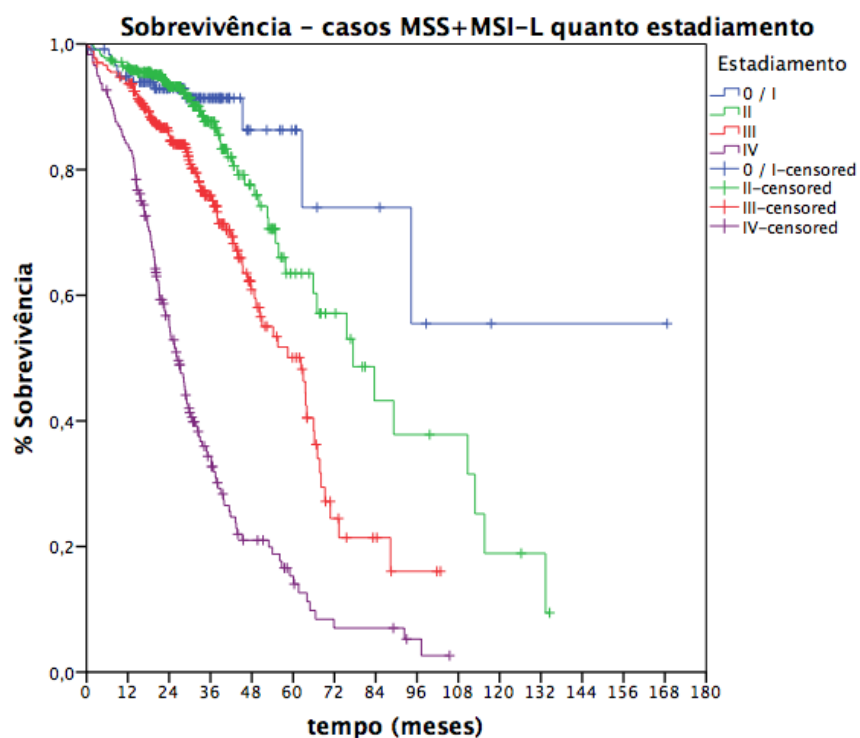


Figura 19 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier.

Para a análise referente ao tipo histológico, observa-se diferença estatisticamente significativa ($p=0,03$). Os casos MSS+MSI-L com tipo histológico adenocarcinoma apresentam uma maior probabilidade de sobrevivência em 1 e em 5 anos quando comparado com os outros tipos histológicos. Por outro lado, os casos do tipo mucinoso apresentam uma maior (83,2%) probabilidade de sobrevivência em 3 anos (Tabela 20) (Figura 20).

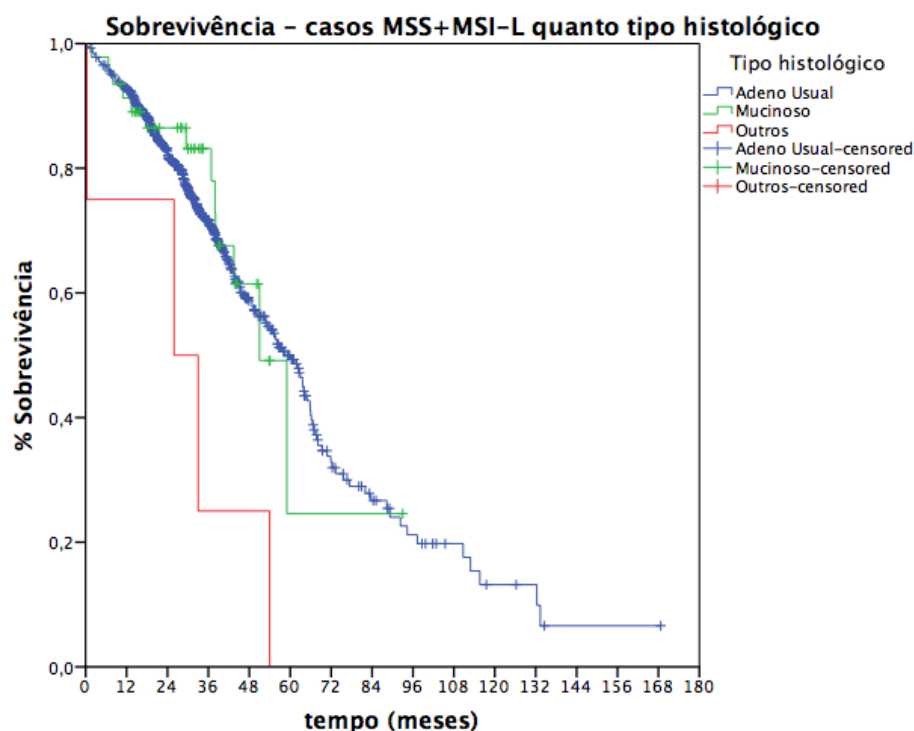


Figura 20 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao tipo histológico pelo método Kaplan-Meier.

A variável grau histológico foi categorizada em Grau I/II e Grau III/Indiferenciado e a análise estatística da sobrevivência para os casos MSS+MSI-L apresentou uma diferença significativa ($p=0,001$) (Tabela 20). Nesta, as amostras Grau I/II possuem uma maior probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos quando comparadas com as amostras de Grau III/Indiferenciado (Tabela 20) (Figura 21).

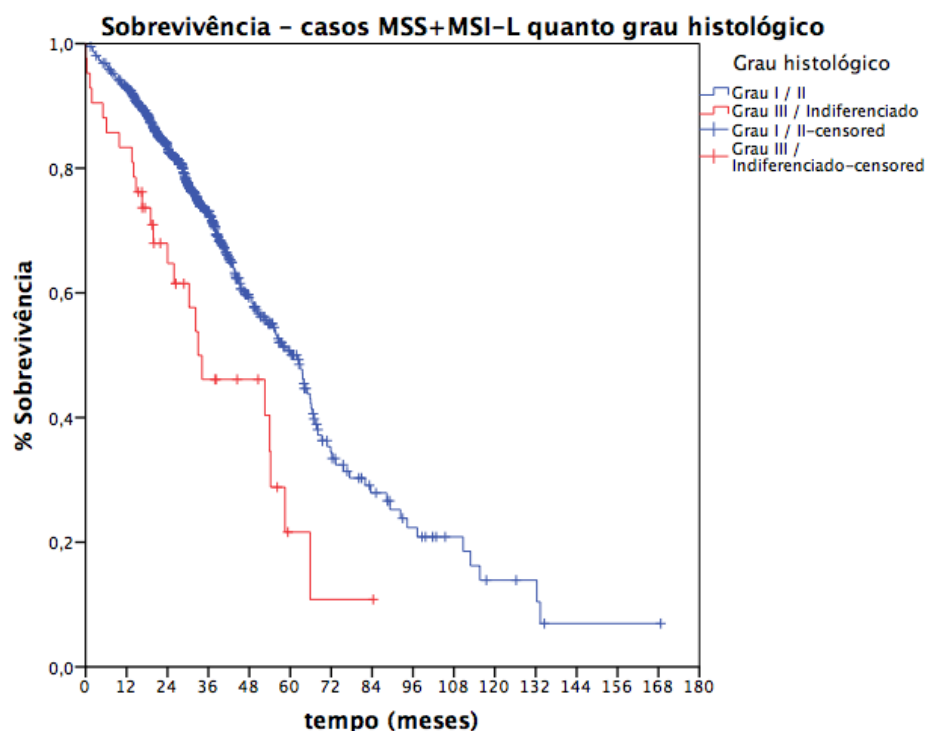


Figura 21 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao grau histológico pelo método Kaplan-Meier.

A variável tratamento quimioterapia foi gerada englobando os pacientes que passaram por quimioterapia tanto neoadjuvante quanto adjuvante, e categorizada em Sim (recebeu tratamento quimioterápico) e Não (não recebeu tratamento quimioterápico). Para a análise estatística da sobrevivência para os casos MSS+MSI-L, observamos uma diferença significativa ($p < 0,001$) (Tabela 20). Nesta, as amostras que passaram por tratamento quimioterápico possuem uma maior probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos (Tabela 20) (Figura 22).

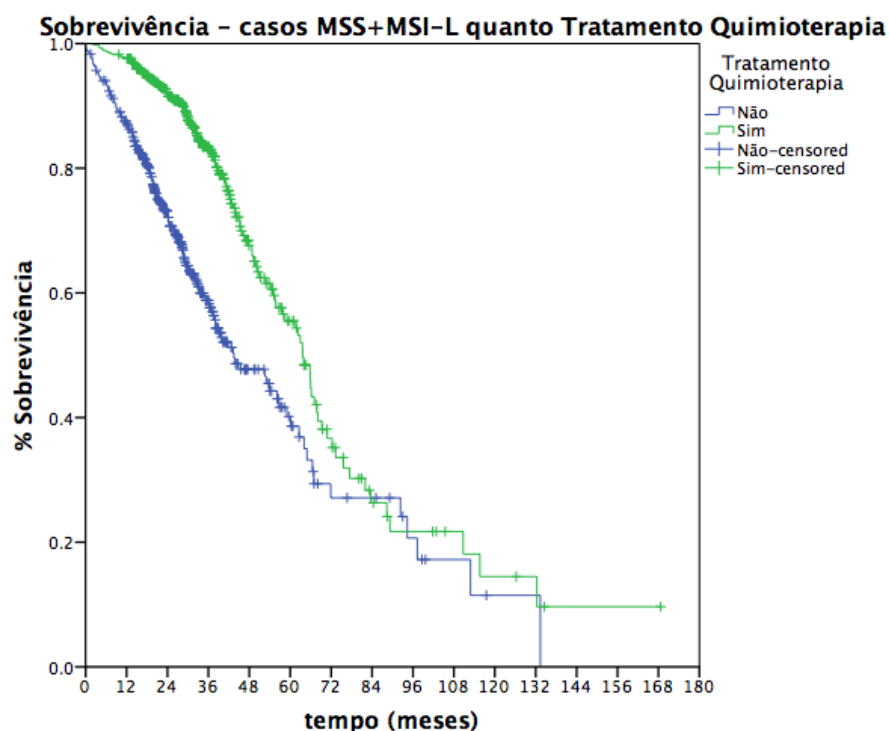


Figura 22 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L quanto ao Tratamento Quimioterapia pelo método Kaplan-Meier.

Os casos MSI-H não apresentaram diferença estatisticamente significativa nas análises referentes a: localização do tumor primário, idade ao diagnóstico, tipo histológico, grau histológico, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia (Tabela 20).

Já para a análise referente ao estadiamento, temos diferença significativa ($p=0,001$) e observamos que os casos estadio III têm a maior (100%) probabilidade de sobrevivência em 1 ano. Para 3 e 5 anos, temos a maior (90%) probabilidade de sobrevivência para os casos estadio 0/I (Tabela 20) (Figura 23).

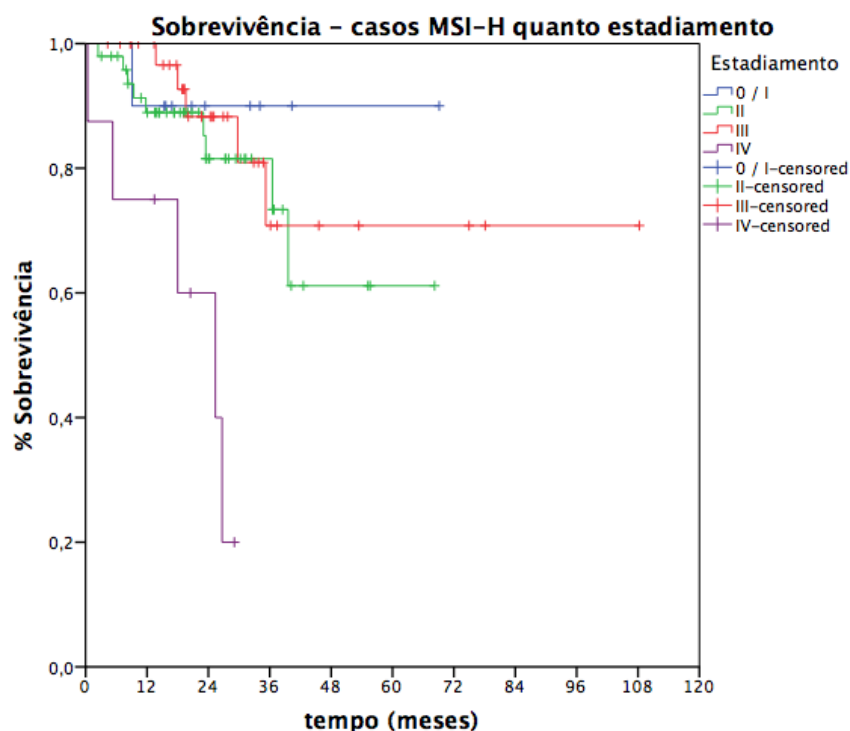


Figura 23 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSI-H quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier.

Assim como para o status MSS+MSI-L, os componentes de ancestralidade (*Score 2*) também foram analisados com relação a sobrevivência e para MSI-H obtivemos diferença significativa ($p=0,02$) para as curvas de sobrevivência (Figura 24). Como mencionado anteriormente, o *Score 2* apresenta uma alta correlação positiva com a ancestralidade asiática, mediante isso, inferimos indiretamente que: quanto menor o componente ancestral asiático maior a probabilidade de sobrevivência em 1, 3 e 5 anos (Tabela 20) (Figura 24).

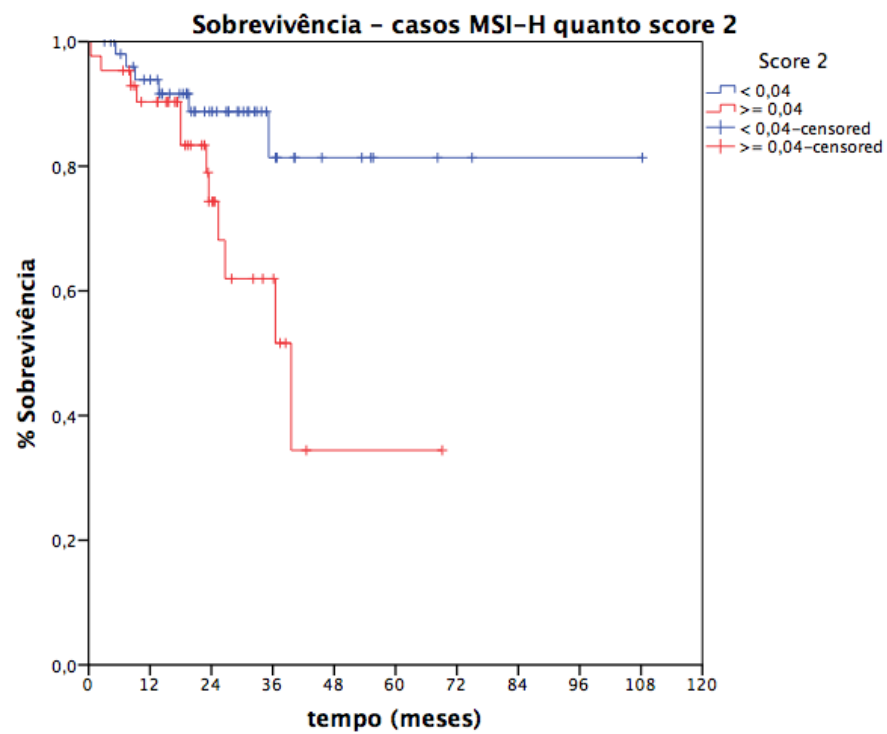


Figura 24 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSI-H quanto ao *Score 2* pelo método Kaplan-Meier.

Tabela 20 – Estimativa da Sobrevida Global (SG) pelo método Kaplan-Meier estratificada pelo status MSI.

Variável	Categoria	MSS+MSI-L						MSI-H					
		N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*
				1 ano	3 anos	5 anos				1 ano	3 anos	5 anos	
Localização tumor primário	Cólon direito	177	58	90,9	71,0	43,5	0,8	71	11	92,3	73,2	73,2	0,58
	Cólon esquerdo/Reto alto	482	152	93,1	70,3	50,2		24	6	91,7	75,7	63,0	
	Reto médio e baixo	227	81	93,4	75,5	47,6		7	3	85,7	64,3	32,1	
Idade ao diagnóstico	<50 anos	255	88	95,3	75,0	54,0	0,02	29	8	92,9	55,2	47,4	0,27
	≥50 e <75 anos	542	180	92,8	71,0	44,7		56	10	90,6	78,4	69,7	
	≥75 anos	90	24	85,4	71,6	63,7		17	1	93,8	93,8	93,8	
Estadiamento	0/I	118	12	94,8	91,4	86,3	<0,001	10	1	90,0	90,0	90,0	0,001
	II	313	52	96,5	87,7	63,5		49	9	88,9	81,5	61,1	
	III	268	86	93,6	75,9	50,1		35	5	100	70,8	70,8	
	IV	177	134	84,1	34,4	15,3		8	5	75,0	20,0	20,0	
Tipo histológico	Adenocarcinoma	837	275	92,9	71,7	50,0	0,03	89	16	90,4	73,0	67,4	0,13
	Mucinoso	46	13	91,3	83,2	24,6		11	3	100	75,0	50,0	
	Outros	4	4	75,0	25,0	Zero		2	1	100	Zero	Zero	
Grau histológico	Grau I / II	831	641	93,1	73,1	50,7	0,001	76	13	90,4	75,4	70,0	0,58
	Grau III / Indiferenciado	42	24	83,3	46,1	21,6		23	5	94,7	63,3	63,3	
Score 2	<0,04	402	123	93,5	70,0	44,2	0,57	53	6	93,9	81,4	81,4	0,02
	≥0,04	425	135	91,5	73,6	52,1		43	12	90,3	62,0	34,4	
Tratamento Quimioterapia	Não	421	171	87,5	58,8	40,2	<0,001	56	13	87,0	66,9	66,9	0,17
	Sim	458	119	97,6	83,4	55,5		44	7	97,5	78,8	60,8	
Tratamento Radioterapia	Não	688	223	92,1	69,4	46,7	0,10	94	17	92,1	74,3	69,0	0,66
	Sim	197	70	94,9	78,7	53,1		8	3	87,5	70,0	46,7	

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. * teste Log Rank.

Visto a importância que o estadiamento tem como fator prognóstico e determinante de tratamento para o CCR, estimativas da sobrevivência global estratificada pelo status MSI para os estadios 0/I, II, III e IV, foram realizadas. De modo geral, não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos estadios (Tabela 21) (Figura 25). O que pode se observar é um p-valor ($p=0,07$) bem próximo da significância para o estadiamento II.

Tabela 21 - Estimativa da Sobrevivência Global (SG) pelo método Kaplan-Meier estratificada pelo status MSI com destaque para a variável Estadiamento.

Estadiamento	Status MSI	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*
				1 ano	3 anos	5 anos	
0/I	MSS+MSI-L	118	12	94,8	91,4	86,3	0,95
	MSI-H	10	1	90,0	90,0	90,0	
II	MSS+MSI-L	313	52	96,5	87,7	63,5	0,07
	MSI-H	49	9	88,9	81,5	61,1	
III	MSS+MSI-L	268	86	93,6	75,9	50,1	0,12
	MSI-H	35	5	100	70,8	70,8	
IV	MSS+MSI-L	177	134	84,1	34,4	15,3	0,35
	MSI-H	8	5	75,0	20,0	20,0	

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. * teste Log Rank.

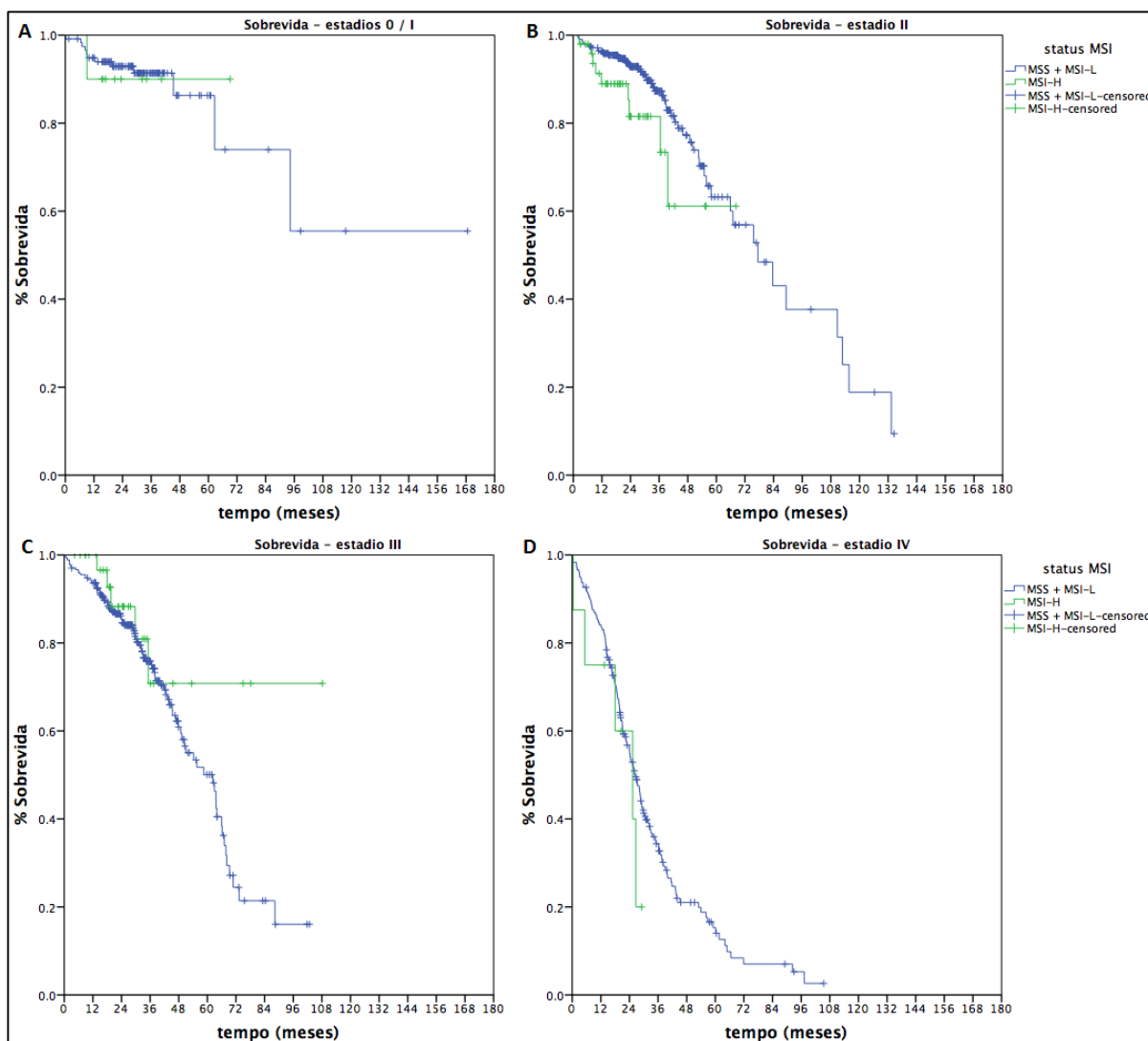


Figura 25 – Estimativa da Sobrevivência dos casos MSS+MSI-L e MSI-H quanto ao estadiamento em 4 categorias pelo método Kaplan-Meier. A: estádios 0/I. B: estadio II. C: estadio III. D: estadio IV

Com as diversas características inerentes aos tumores que apresentam MSI, foi apresentado na Introdução a presença de resistência ou sensibilidade a certos tratamentos para esses casos. Sendo o emprego do 5-fluorouracil (5-FU) importante no tratamento do CCR, estimamos a sobrevivência global estratificada pelo status MSI para Tratamento 5-fluorouracil neoadjuvante + adjuvante, neoadjuvante ou adjuvante separadamente e ainda nos casos com estadio II que receberam tratamento tanto neoadjuvante quanto adjuvante e ambos os tratamentos. Observamos que não houve diferença estatisticamente significativa para nenhum dos tratamentos empregados quando comparadas as curvas de sobrevivência estratificadas quanto ao status MSI (Tabela 22).

Tabela 22 – Estimativa da Sobrevivência Global, pelo método Kaplan-Meier, dos casos de CCR tratados com 5-fluorouracil, quanto ao status MSI.

Tratamento 5-fluorouracil*	Variável	Categoria	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor**
					1 ano	3 anos	5 anos	
neoadjuvante + adjuvante [#]	status MSI	MSS+MSI-L	454	118	97,6	83,3	54,9	0,50
		MSI-H	42	6	97,4	76,3	66,8	
neoadjuvante	status MSI	MSS+MSI-L	147	45	95,9	80,9	48,2	0,48
		MSI-H	3	1	100	50	50	
adjuvante	status MSI	MSS+MSI-L	393	94	98,7	85,4	55,7	0,44
		MSI-H	41	5	97,3	84,1	73,6	
neoadjuvante + adjuvante com estadio II ^{##}	status MSI	MSS+MSI-L	191	37	97,4	88,3	56,6	0,51
		MSI-H	12	2	91,7	91,7	61,1	

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. *regimes de tratamento: Mayo Clinic, QUASAR, Roswell Park, FOLFOX, FLOX, XELOX e Fluoropirimidina oral. ** teste Log Rank. [#] engloba casos que receberam tratamento neoadjuvante, adjuvante e ambos os tratamentos. ^{##} engloba casos com estadio II que receberam tratamento neoadjuvante, adjuvante e ambos os tratamentos.

4.12 Análise de Sobrevivência Morte Específica

Foi gerada tabela de estimativa de sobrevivência e gráficos de curvas de Kaplan-Meier por meio do software SPSS (versão 21). A tabela contém o número de casos (N casos) analisados para cada categoria das variáveis em questão, assim como, o número de eventos observados (N eventos), sendo o óbito (por câncer) do paciente, o evento. Ainda nela, temos a probabilidade de sobrevivência (%) estimada para 1, 3 e 5 anos, além do p-valor, para as comparações entre as categorias das variáveis, obtido pelo teste de Long Rank.

Observamos uma probabilidade de sobrevivência morte específica para os pacientes CCR estimada para 1 ano de 96%, para 3 anos de 75,5% e para 5 anos de 52,5% (Tabela 23) (Figura 26). Temos ainda, que a sobrevivência mediana foi calculada em 62 meses (IC95%: 57 – 68) e o tempo médio de seguimento dos casos foi de 31 meses (desvio-padrão de 20 meses).

Quando estratificamos os casos para o *status* MSI (MSS+MSI-L e MSI-H), não observamos diferença estatisticamente significativa entre as duas curvas (Figura 27). Embora isso, os dados demonstram uma probabilidade para 1 ano de 96% nos casos MSS+MSI-L e de 96,7% nos casos MSI-H; para 3 anos de 75,2% para MSS+MSI-L e de 77,7% em MSI-H e para 5 anos de aproximadamente 52% para MSS+MSI-L e de 67,7% para MSI-H (Tabela 23).

Tabela 23 – Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR e estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) quanto ao *status* MSI, pelo método Kaplan-Meier.

Variável	Categoria	N casos	N eventos	Probabilidade (%)			p-valor*
				1 ano	3 anos	5 anos	
Geral	-	989	266	96,0	75,5	52,5	-
<i>status</i> MSI	MSS+MSI-L	887	252	96,0	75,2	51,6	0,16
	MSI-H	102	14	96,7	77,7	67,7	

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites.* teste Log Rank.

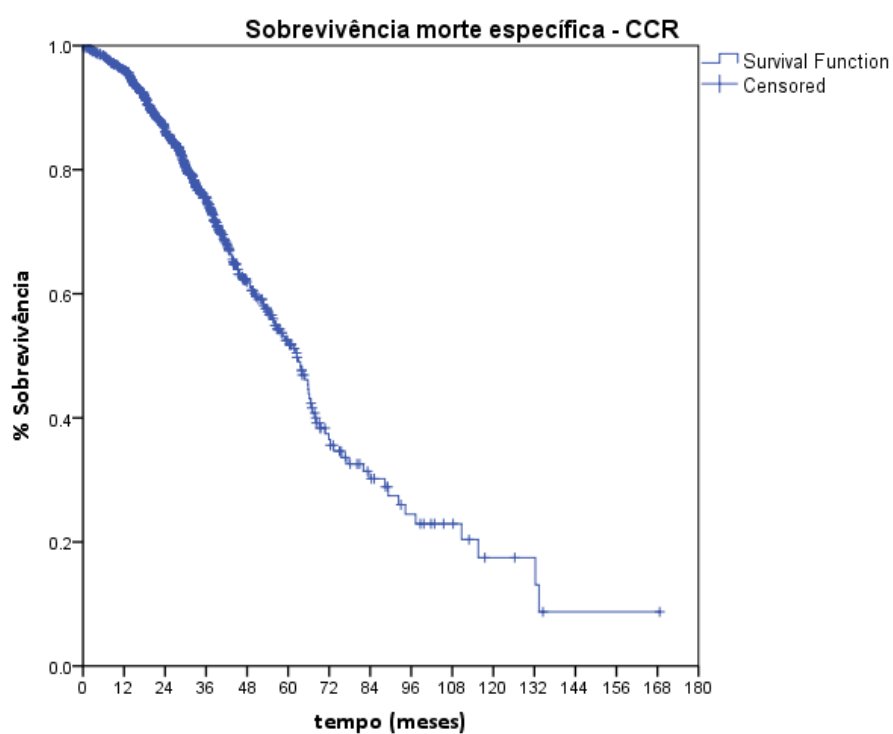


Figura 26 – Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR pelo método Kaplan-Meier.

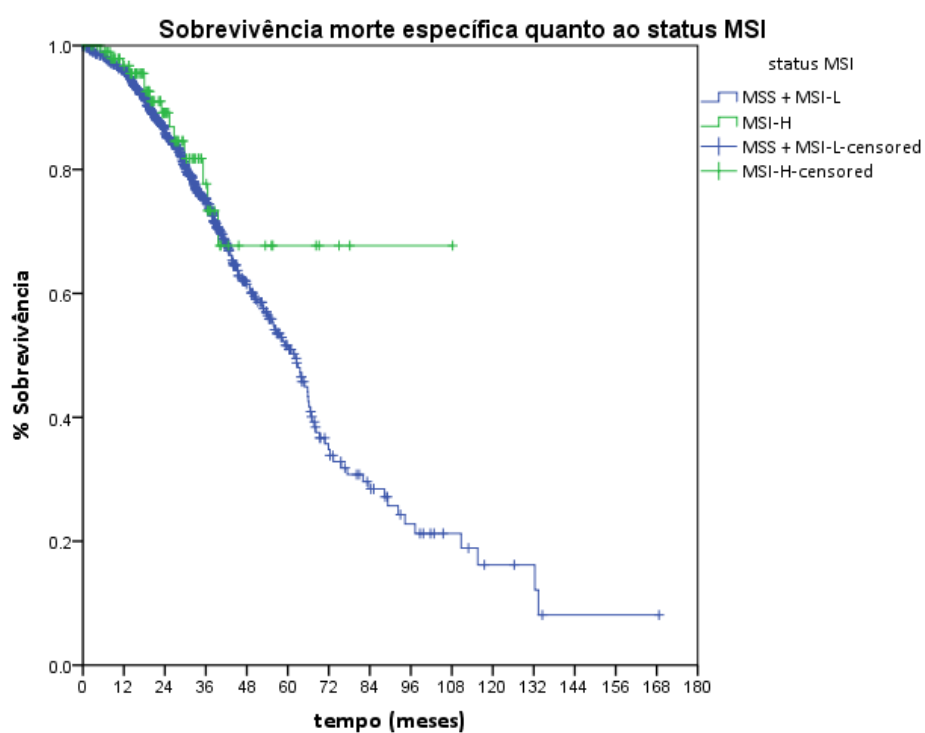


Figura 27 – Estimativa da Sobrevivência morte específica (óbito por câncer) dos casos de CCR quanto ao *status* MSI pelo método Kaplan-Meier.

4.13 Análise Multivariada para a sobrevivência por meio de regressão de Cox

A análise multivariada para a estimativa da sobrevivência global foi realizada utilizando o Modelo de Riscos Proporcionais de Cox. O referido modelo foi utilizado para estimar o risco relativo de sofrer o evento (óbito) para cada uma das variáveis que compuseram o modelo.

Para os casos MSS+MSI-L, as variáveis que iniciaram a modelagem foram: grau histológico, tipo histológico, estadiamento, idade ao diagnóstico, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia. Já para as amostras MSI-H, as variáveis foram: score 2, tipo histológico, estadiamento, idade ao diagnóstico, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia.

Por meio do modelo de regressão de Cox, estimamos o Risco Relativo simples (RR) e Risco Relativo múltiplo (RR_{AJ}). O RR foi obtido com o modelo de Cox simples, onde cada variável foi analisada individualmente e o RR_{AJ} foi estimado pelo modelo de Cox múltiplo, com as variáveis analisadas conjuntamente.

O modelo múltiplo final ajustado (RR_{AJ}) para o grupo de pessoas com *status* MSS+MSI-L foi composto pelas variáveis: grau histológico, estadiamento, idade ao diagnóstico, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia (Tabela 24). Para os casos com grau histológico III/Indiferenciado foi estimado um risco maior de ocorrer o óbito em comparação com o grau I/II. Em ambos os modelos (RR e RR_{AJ}) a variável se apresentou estatisticamente significativa e com valores de risco relativo semelhantes (Tabela 24). Para o estadiamento foi estimado um risco maior de ocorrer o óbito para os indivíduos dos estádios II, III e IV em comparação com o estágio I. Podemos observar que no modelo simples (RR), não há diferença estatisticamente significativa para o estágio II e ainda que os valores estimados de risco são menores para todas as categorias (Tabela 24). Foi estimado que o risco (RR_{AJ}) de óbito aumenta com o aumento da idade, tendo sido estimado os valores 1,38 ($p=0,02$) para a categoria ≥ 50 e < 75 anos e 1,93 ($p=0,008$) para a faixa ≥ 75 anos, em comparação com a faixa < 50 anos. Em ambos os modelos (RR e RR_{AJ}) a variável se apresentou estatisticamente significativa e com valores de risco relativo semelhantes (Tabela 24). Para o tratamento quimioterapia, foi estimado que o risco de óbito diminui para os pacientes que receberam tratamento. Tanto para o modelo simples (RR) (0,47 e $p<0,001$) quanto para o modelo múltiplo (RR_{AJ}) (0,57 e $p<0,005$) a variável se comportou de modo semelhante (Tabela 24).

Para os casos com status MSI-H o modelo múltiplo final ajustado (RR_{AJ}) foi composto pelas variáveis estadiamento, idade ao diagnóstico, tratamento quimioterapia e tratamento radioterapia (Tabela 25). Para o estadiamento, o risco estimado não foi estatisticamente significativo para nenhum dos estadios analisados no modelo múltiplo (RR_{AJ}) em comparação com o estadio I. Diferentemente, para o modelo simples (RR) temos apenas uma diferença ($p=0,03$) entre os estadios I e IV, com este apresentando um risco de óbito aumentado em 10,6 (Tabela 25). Quanto à variável idade ao diagnóstico, nenhuma comparação apresentou diferença significativa em nenhum dos modelos (RR e RR_{AJ}), mas se observa uma redução no risco de óbito com o aumento da idade para ambos os modelos de Cox (Tabela 25). Tanto para o tratamento quimioterapia quanto para o tratamento radioterapia, não foram observadas diferenças significativas para as comparações realizadas em nenhum dos modelos de Cox analisados (RR e RR_{AJ}) (Tabela 25).

Tabela 24 – Estimativa do Risco Relativo pelo Modelo de Cox para os tempos de sobrevivência global nas amostras MSS+MSI-L.

status MSI	Variável	Categoria	N casos	N eventos	RR	IC 95%		p- valor	N casos	N eventos	RR _{AJ}	IC 95%		p- valor
						inferior	superior					inferior	superior	
MSS + MSI-L	Grau histológico	Grau I/II	831	265	1	-	-	-	813	254	1	-	-	-
		Grau III/Indiferenciado	42	24	2,06	1,35	3,13	0,001	42	24	1,75	1,14	2,66	0,01
	Estadiamento	0/I	118	12	1	-	-	-	114	12	1	-	-	-
		II	313	53	1,67	0,89	3,13	0,11	308	51	2,23	1,16	4,29	0,016
		III	268	86	3,27	1,78	6,01	<0,001	258	83	5,26	2,66	10,4	<0,001
		IV	177	134	9,62	5,31	17,45	<0,001	175	132	10,1	5,52	18,3	<0,001
	Idade ao diagnóstico	<50 anos	255	88	1	-	-	-	244	86	1	-	-	-
		≥50 e <75 anos	542	181	1,39	1,07	1,80	0,014	523	170	1,38	1,06	1,79	0,02
		≥75 anos	90	24	1,62	1,02	2,57	0,04	88	22	1,93	1,18	3,14	0,008
	Tratamento Quimioterapia	Não	421	171	1	-	-	-	413	167	1	-	-	-
		Sim	458	119	0,47	0,37	0,59	<0,001	442	111	0,57	0,38	0,85	0,005
	Tratamento Radioterapia	Não	688	223	1	-	-	-	669	215	1	-	-	-
		Sim	197	70	0,79	0,61	1,04	0,10	186	63	0,98	0,72	1,33	0,92

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. RR: Risco Relativo estimado pelo Modelo de Cox simples (cada variável analisada individualmente). RR_{AJ}: Risco Relativo estimado pelo Modelo de Cox múltiplo (variáveis analisadas conjuntamente).

Tabela 25 – Estimativa do Risco Relativo pelo Modelo de Cox para os tempos de sobrevivência global nas amostras MSI-H.

status MSI	Variável	Categoria	N casos	N eventos	RR	IC 95%		p- valor	N casos	N eventos	RR _{AJ}	IC 95%		p- valor
						inferior	superior					inferior	superior	
MSI-H	Estadiamento	0/I	10	1	1	-	-	-	10	1	1	-	-	-
		II	49	9	2,04	0,26	16,1	0,50	48	9	1,6	0,18	13,8	0,67
		III	35	5	1,48	0,17	12,7	0,72	34	5	1,76	0,14	22,2	0,66
		IV	8	5	10,6	1,2	93,2	0,03	8	5	6,64	0,71	61,9	0,09
	Idade ao diagnóstico	<50 anos	29	9	1	-	-	-	29	9	1	-	-	-
		≥50 e <75 anos	56	10	0,68	0,28	1,69	0,41	54	10	0,74	0,29	1,92	0,54
		≥75 anos	17	1	0,22	0,03	1,75	0,15	17	1	0,24	0,028	2,07	0,19
	Tratamento Quimioterapia	Não	56	13	1	-	-	-	56	13	1	-	-	-
		Sim	44	7	0,53	0,21	1,33	0,17	44	7	0,43	0,09	1,99	0,28
	Tratamento Radioterapia	Não	94	17	1	-	-	-	92	17	1	-	-	-
		Sim	8	3	1,32	0,38	4,6	0,66	8	3	1,9	0,42	8,60	0,40

N: número. MSS: estabilidade de microssatélites, MSI-L: baixa instabilidade de microssatélites, MSI-H: alta instabilidade de microssatélites. RR: Risco Relativo estimado pelo Modelo de Cox simples, ou seja, para cada variável individualmente. RR_{AJ}: Risco Relativo estimado pelo Modelo de Cox múltiplo, ou seja, para as variáveis conjuntamente.

5 DISCUSSÃO

O câncer é um dos principais problemas de saúde pública, tanto para as sociedades mais desenvolvidas quanto para as menos desenvolvidas. A sua ocorrência vem aumentando devido ao crescimento e envelhecimento da população, bem como um aumento da prevalência de fatores de risco, como tabagismo, obesidade, sedentarismo e mudança de estilo de vida associado à urbanização e ao desenvolvimento econômico. Com base na Globocan 2012, cerca de 14 milhões de novos casos de câncer e 8,2 milhões de mortes ocorreram em 2012 em todo o mundo. Ao longo dos anos, a questão do câncer se agravou mais nos países em desenvolvimento, que representam cerca de 57% dos casos e 65% das mortes por câncer em todo o mundo¹.

Os fatores etiológicos e os mecanismos patogênicos subjacentes ao desenvolvimento do CCR são complexos e heterogêneos. Com toda a complexidade inerente ao CCR, que se observa em diversos estudos da literatura internacional representando distintas regiões geográficas, o presente trabalho vem contribuir com a compreensão deste tipo tumoral na população brasileira, através d análise da frequência de diversas características clínico-patológicas, moleculares e estudo das contribuições genéticas e clínicas que a miscigenação populacional brasileira possa acarretar.

5.1 Dados demográficos e clínico-patológicos dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos

No presente trabalho, quando analisamos os dados demográficos e as características clínico-patológicas, observamos que a maioria das frequências estão dentro dos valores descritos previamente na literatura internacional e nacional (Tabela 26). A análise detalhada e associações clínico-patológicas relevantes desta série, são alvo de outro estudo do nosso grupo de pesquisa, estando descritas em dissertação de mestrado.

Tabela 26 – Dados demográficos e clínico-patológicos descritos previamente neste presente estudo e nas literaturas internacional e nacional.

	Ano divulgação	Origem amostral	N amostral	Sexo*	Idade média ao diagnóstico (anos)	Localização tumor primário*	Estadiamento*
Presente estudo	2017	Brasil	1013	masculino (52%)	58	cólon distal (51%)	II
INCA⁶	2016	Brasil	Populacional (INCA)	feminino	-	-	-
Leite et al.¹⁰⁹	2010	Brasil	66	feminino (62%)	63	cólon distal	-
Ferreira et al.¹¹⁰	2014	Brasil	8234	masculino (52%)	59	-	-
Chaves et al.¹¹¹	2000	Portugal	76	masculino (54%)	58	cólon distal (42%)	II
Torre et al.¹	2015	GLOBOCAN 2012 (Mundo)	Populacional (GLOBOCAN)	masculino	-	-	-
Miller et al.³	2016	EUA	-	-	68	-	-
Siegel et al.⁴	2017	EUA	Populacional (SEER)	igualdade entre sexos	-	-	-
Simons et al.¹¹²	2013	Holanda	509	masculino (54%)	68	cólon distal	II
Gonsalves et al.¹¹³	2014	EUA	2326	masculino	60	cólon distal	III
Nam et al.¹¹⁴	2016	Coréia do Sul	191	masculino (54%)	60	cólon distal	IV

N: número. *: categoria predominante. INCA: Instituto Nacional de Câncer. SEER: Surveillance Epidemiology and End Results. -: não informado.

5.2 Padronização da técnica de análise de MSI, comparação com a análise imunoistoquímica e análise de MSI em pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos

No CCR, anormalidades genômicas ocorrem em um padrão não aleatório na evolução adenoma-carcinoma e posteriores lesões avançadas e a formação de metástases. Há três vias conhecidas na patogênese do CCR: instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélite (MSI), e o fenótipo metilante (CIMP)^{33, 34}. Com o advento da medicina personalizada, a necessidade e a importância de biomarcadores de prognóstico ou diagnóstico tem aumentado. Alterações dos genes *Mismatch repair* (MMR) influenciam no tamanho dos microssatélites e assim, a MSI é empregada como um marcador fenotípico de falhas no mecanismo de reparo das células. A presença de MSI vem sendo usada como um biomarcador para diversas finalidades no CCR, como: I) rastreamento de casos hereditários; II) marcador de prognóstico, onde casos apresentando MSI possuem um melhor prognóstico que aqueles que não o apresentam; III) resistência à terapia com 5-FU e sensibilidade a irinotecan e recentemente, IV) imunoterapia³⁴.

Uma das técnicas moleculares mais utilizada na análise de MSI é aquela em que se realiza uma PCR *multiplex* composta de 5 marcadores mononucleotídicos (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26) e que pode ser realizada sem o uso de DNA de tecido normal como referência. Neste contexto, é fundamental a determinação do intervalo de variação quasimonomórfico (*Quasimonomorphic Variation Range* - QMVR) para cada marcador. O QMVR do presente trabalho foi estabelecido após análise de 214 indivíduos saudáveis (oriundos de diversos estados brasileiros, como: São Paulo, Minas Gerais, Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco e Rondônia), cujos tamanhos dos alelos e as frequências absolutas/relativas para cada marcador foram determinados.

Com a determinação do QMVR, observou-se que 23 indivíduos (Tabela 3) possuíam alelos fora do intervalo, sendo que nenhum deles exibia mais de um marcador fora do intervalo. Assim, indivíduos com instabilidade em mais de dois marcadores foram precisamente classificados como apresentando MSI-H e para classificar como MSI-L, é necessário a alteração de somente um marcador. Estes dados foram detalhadamente descritos e discutidos no artigo - *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers*, publicado por

nosso grupo. Após a determinação do QMVR e padronização da técnica, nossa metodologia foi submetida a processo de acreditação internacional pelo UK NEQAS (*United Kingdom National External Quality Assessment Service*), obtendo anualmente 100% de acerto na detecção dos marcadores e correta genotipagem das amostras enviadas.

Com a padronização da técnica molecular de análise de MSI, pudemos analisar os 1013 casos brasileiros incluídos no nosso trabalho e determinar a frequência desta alteração. Encontramos 85,8% de casos com fenótipo MSS, 3,7% de casos MSI-L e 10,5% de casos exibiram MSI-H. Tal como previamente enumerado, a identificação da MSI no CCR é importante e se faz possível não apenas por métodos moleculares, mas também por técnicas de imunoistoquímica (IHQ). Para isso, a análise realizada por um patologista consiste em detectar a perda da expressão das proteínas, que compõem o MMR (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) no tumor em comparação a mucosa normal e como resultado, tem-se a expressão positiva ou negativa dessas proteínas¹¹⁵. No presente trabalho, por IHQ, a frequência de casos com MSI foi de 10,2%, porcentagem essa muito similar a obtida pela técnica molecular o que confirma a efetividade da identificação de casos com MSI por parte da técnica molecular otimizada e empregada. Nós observamos uma concordância (Teste Kappa) de 95,6% entre ambas as metodologias ($p < 0,001$), comprovando estatisticamente que houve concordância entre as duas técnicas. Essa concordância e efetividade em se determinar a presença de MSI entre ambas as técnicas já foi descrita por diversos trabalhos¹¹⁶⁻¹¹⁸ na literatura e corrobora nossos achados. Além da elevada concordância, ao se utilizar a IHQ como padrão-ouro para determinar a MSI, os valores da análise de Sensibilidade, Especificidade e Acurácia do teste molecular foram: 99,5%, 96,1% e 99,2%, respectivamente.

Apesar da elevada concordância, em oito casos nós observamos discordância entre a IHQ e a análise molecular de MSI. Nestes casos, nós realizamos análises complementares de potenciais genes MSI-alvo observando outras regiões de microssatélites. Todos os casos que se apresentaram MSI-H e Positivo para a imunoistoquímica exibiram genes MSI-alvo com alteração, variando de 3 a 8 genes. Por outro lado, nenhum dos casos que se apresentaram MSS e Negativo para a imunoistoquímica apresentaram genes MSI-alvo com alteração. Nos casos MSI-L, observaram-se genes MSI-alvo alterados também. Isto sugere que a análise molecular empregada no presente trabalho detectou melhor o fenótipo MSI no CCR. Na literatura internacional, trabalhos como Lin et al.¹¹⁹ obtiveram 23 (32,9%) casos discordantes

para a mesma comparação. O painel de marcadores moleculares utilizado pode justificar essa elevada porcentagem de discordância, onde, marcadores dinucleotídicos são conhecidamente menos sensíveis em comparação com marcadores mononucleotídicos¹²⁰, que foram utilizados pelo nosso trabalho. Patil et al.¹²¹ utilizaram um painel de cinco marcadores similares aos utilizados pelo presente trabalho e a concordância entre as técnicas foi de 100%. Este valor muito próximo do obtido pelo nosso trabalho, confirma a eficiência em se determinar o *status* MSI por técnica molecular empregando marcadores mononucleotídicos (fato corroborado pela literatura internacional^{48, 52, 122}), como os utilizados pelo nosso painel.

Além disso, a técnica molecular é vantajosa por ser realizada por meio de uma reação multiplex com cinco pares de primers marcados com fluorescência, o produto amplificado ser composto na média por 100 pares de bases que podem ser analisados por eletroforese capilar e apresentar um custo reduzido por paciente analisado. Em situações de escassez de material tumoral, essa técnica é mais efetiva que a IHQ, pois pode ser realizada com apenas um corte de material tumoral, ao contrário dos quatro cortes necessários para a análise de IHQ¹²². Em resumo, a análise molecular de MSI tem como vantagens em relação a IHQ: ausência de um patologista experiente para análise; análise mais objetiva, em comparação com a avaliação do padrão de coloração das lâminas na reação de IHQ, sendo os padrões de amplificação molecular mais reprodutíveis; os testes de qualidade são mais rápidos e simples de se realizar; pode se identificar tumores MSI-H que apresentam falhas no MMR mas possuem marcação protéica devido a uma mutação *missense* não-truncada ou a mutações em outras proteínas do MMR que não são incluídas no painel de IHQ e a necessidade de pouco material tumoral para a análise molecular¹¹⁸.

A análise comparativa das nossas frequências de MSI-H, MSI-L e MSS evidenciou valores próximos dos reportados em outros estudos (Tabela 27). A frequência internacional do *status* MSI-H está entre 12-15% para o CCR, sendo que dois-terços desses casos são esporádicos^{33, 123}. De acordo com dados do TCGA (*The Cancer Genome Atlas Network*) para CCR, 16% da casuística analisada apresentou um quadro de alta instabilidade de microssatélites (MSI-H), sendo que 12% desses com MSI oriunda da hipermetilação/silenciamento de *MLH1* e 4% com MSI devido a mutações somáticas em genes do MMR³⁵. Assim, no presente trabalho, a porcentagem de casos MSI-H (10,5%) encontrou-se ligeiramente inferior ao intervalo relatado pela literatura internacional. No

entanto, trabalhos¹²⁴⁻¹²⁶ da literatura relatam variações na frequência de MSI-H dentre os estádios do CCR, com: 15–20% para casos estadio II, 7–13% para estadio III e 3–8% para estadio IV. Isso se aproxima do valor relatado no presente estudo e do fato de termos observado maior frequência de casos com estadio mais avançado.

Tabela 27 – Dados de frequência de MSI descritos previamente neste presente estudo e nas literaturas internacional e nacional.

	Ano divulgação	Origem amostral	N amostral	Casos MSI-H (%)
Presente estudo	2017	Brasil	1013	10,5
Leite et al.¹⁰⁹	2010	Brasil	66	22,7
The Cancer Genome Atlas Network³⁵	2012	TCGA	224	16
Chaves et al.	2000	Portugal	76	12
Nam et al.¹¹⁴	2016	Coréia do Sul	191	1,6
Markovic et al.⁵⁷	2013	Sérvia	200	3,4
Kim et al.¹²⁷	2014	Coréia do Sul	1867	7,5
Miwata et al.¹²⁸	2014	Japão	233	8
Krivokapic et al.¹²⁹	2012	Sérvia	150	9
Yoon et al.¹³⁰	2011	Coréia do Sul	2028	10,5
Gonsalves et al.¹¹³	2014	EUA	2326	13
Miwata et al.¹²⁸	2014	Vietnã	60	22
Simons et al.¹¹²	2013	Holanda	509	12,6
Soreide¹³¹	2011	Noruega	121	27,3

N: número. MSI-H: alta instabilidade de microsatélite.

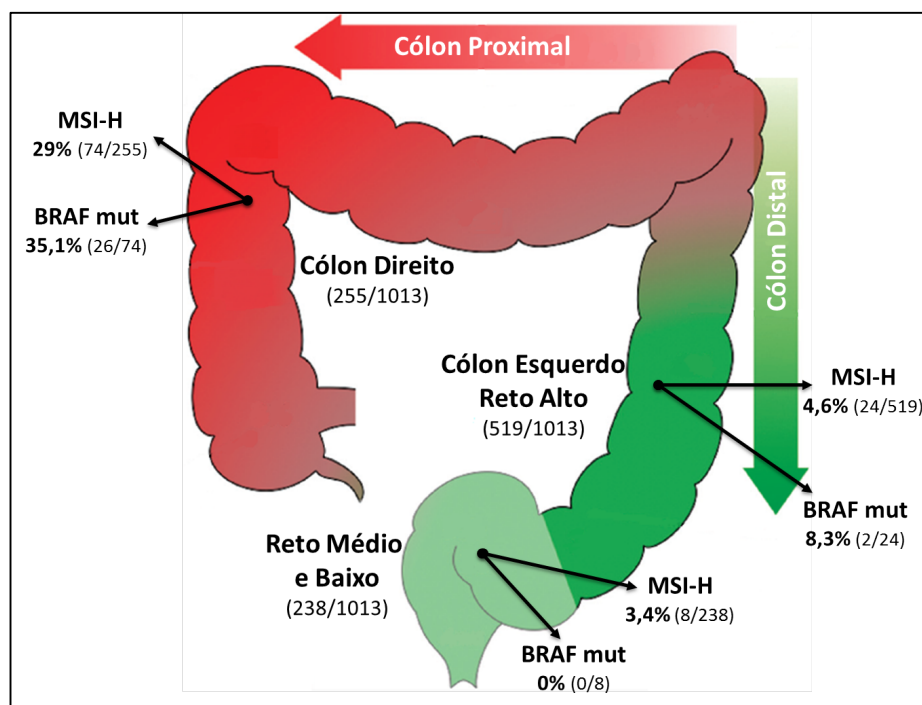
A discrepância entre nossos resultados e outros trabalhos com relação a proporção de MSI-H pode ser causada por diversos fatores, tais como: diferenças metodológicas empregadas na determinação do *status* MSI nas casuísticas analisadas, visto que em vários trabalhos o painel de marcadores analisados diferia com o do presente trabalho; distintos critérios de inclusão de pacientes; diferentes etnias dos pacientes analisados e critérios ambientais que podem afetar a presença da MSI no CCR. O presente trabalho elucida a frequência de MSI de maneira robusta por analisar uma casuística ampla em uma população miscigenada como a do Brasil.

5.3 Associação do *status* de MSI com as características clínico-patológicas dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos

A correlação do *status* MSI com os dados demográficos e clínico-patológicos evidenciou várias associações significativas ($p < 0,05$) em análise univariada. Os casos que exibiram fenótipo MSI-H apresentaram: tumor primário localizado no cólon direito (Figura 28); estadiamento II; metástases classificadas em M0; tipo histológico mucinoso; grau histológico III/Indiferenciado; presença de tumor sincrônico; ausência de metástase ao diagnóstico, não recorrência da doença e casos vivos sem doença. Estes resultados estão em concordância com Leite et al.¹⁰⁹, que também encontraram diferença estatisticamente significativa para localização do tumor. De igual forma, Yoon et al.¹³⁰ reportaram que pacientes MSI-H apresentavam tumores no cólon direito, incidência inferior de metástase linfonodal, histologia mucinosa ou pouco diferenciada e adenomas sincrônicos. Ainda, Fleming et al.¹³², encontraram que tumores localizados no cólon direito ou com histologia mucinosa ocorreram em pacientes MSI-H, com os trabalhos de Vilar et al.¹³³ e de Ronnekleiv-Kelly et al.¹³⁴, que demonstraram uma maior prevalência de estadio II nos casos MSI-H e com os trabalhos de Sinicrope et al.¹³⁵ e de Ronnekleiv-Kelly et al.¹³⁴ que também encontraram associação com o *status* MSI-H e não recorrência da doença. Por outro lado, Yoon et al.¹³⁰ descrevem que pacientes MSI-H eram mais jovens (< 50 anos de idade ao diagnóstico).

Posteriormente, por meio de análise multivariada reforçamos a associação do *status* MSI-H com: tumores primários localizados no cólon direito, grau histológico III/Indiferenciado e pacientes vivos sem doença. Estes resultados estão de acordo com a

literatura internacional^{109, 114, 130, 132, 136}, reforçando o papel de biomarcador de prognóstico nestes pacientes.



Fonte: Adaptado de Soreide 2011.

Figura 28 – Porcentagens do *status* de MSI-H e de *BRAF* V600E, para os casos de câncer colorretal analisados, distribuídas pela localização do cólon.

5.4 Análises de mutação em *BRAF* (V600E) e de metilação de *MLH1* em pacientes com CCR e MSI-H do Hospital de Câncer de Barretos

O CCR é uma doença heterogênea definida por diversas mutações nos receptores tirosina-cinase (RTKs) ou em componentes da via intracelular ativada por esses receptores, podendo apresentar concomitantes alterações no mesmo tumor¹³⁷. No CCR, o gene *BRAF* está mutado em 5-15% dos casos^{132, 137, 138}, sendo em 90% dos casos a mutação *hotspot* V600E. A presença desta mutação está associada a um pior prognóstico dos pacientes¹³⁹, idade ao diagnóstico mais tardia e maior probabilidade de serem pacientes do sexo feminino¹³⁸. Importante também mencionar que pacientes CCR com estadios IV e mutação *BRAF* V600E não respondem a terapia com inibidores de EGFR^{34, 137}. Mutações em *BRAF* estão mais associadas com o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP) e quando associada ao

status MSI-H é indicativa da natureza esporádica do tumor^{132, 140}. No presente trabalho, a mutação *BRAF* V600E foi analisada apenas nas amostras MSI-H e encontramos a alteração em 26,4% desses casos. Esta porcentagem está abaixo do relatado pela literatura onde 40-60% dos casos MSI-H apresentam essa mutação^{140, 141}. Ainda, podemos observar que a grande maioria dos tumores mutados *BRAF* V600E estavam localizados no cólon direito (Figura 28), local esse que apresentou a maior frequência de casos MSI-H e que nenhum dos casos analisados na porção reto médio e baixo apresentaram mutação.

Em pacientes com MSI, a inativação dos genes do MMR pode ser hereditária (Síndrome de Lynch – HNPCC) devido a mutações germinativas dos genes do MMR ou somáticas (casos esporádicos) devido principalmente a metilação da região promotora dos genes do MMR. A perda da função de reparo de DNA em casos hereditários não é devida apenas pela alteração germinativa, mas também pela inativação do outro alelo selvagem, enquanto que nos casos somáticos, a perda do reparo ocorre em especial pela metilação da região promotora do *MLH1*¹⁴². De um modo geral, aproximadamente 90% dos CCR que possuem *status* MSI-H resultam da metilação de *MLH1*¹¹³, aqueles com tumores localizados no cólon direito apresentam metilação em 30-40% dos tumores, enquanto que no cólon esquerdo e reto essa frequência é de 5-15%^{142, 143}. Este mecanismo de inativação de *MLH1* não parece condicionar a resposta dos pacientes ao tratamento com 5-FU, no entanto, há relatos de uma melhor resposta aos regimes contendo irinotecan em casos metilados³⁴ e, não sendo conclusivo o seu papel na resposta à terapia FOLFOX¹⁴⁴.

No presente trabalho, analisamos 65 casos dos 1013 que tinham exibido perda da expressão proteica de MLH1 por IHQ. Observamos metilação em 72,3% deles o que nos permite inferir que o silenciamento da região promotora do *MLH1* é o principal evento subjacente à MSI e ainda inferimos que, dos casos com perda de MLH1, aproximadamente dois-terços tratam-se de casos esporádicos.

5.5 Estudo de potenciais genes MSI-alvo em pacientes com CCR e MSI-H do Hospital de Câncer de Barretos

A inativação dos genes do MMR leva a deficiência do mecanismo de reparo de DNA e consequente surgimento do fenótipo MSI nas células. Essa instabilidade pode atuar em qualquer região de microssatélite presente no genoma e assim causar mutações do tipo inserção/deleção. Genes com sequências de microssatélite são assim potenciais genes MSI-

alvo⁴⁰. As alterações de microssatélites que ocorrem em regiões codificadoras, intróns ou regiões gênicas não traduzíveis podem influenciar positivamente ou negativamente a expressão gênica ou a função proteica, por afetarem a transcrição ou os sítios de *splicing*^{145, 146}. No trabalho de Hause et al.⁴³, observou-se que microssatélites instáveis em regiões gênicas sustentam a ideia que eles preferencialmente se acumulam em genes envolvidos na carcinogênese ou na sobrevivência do tumor e, portanto, provavelmente servem como direcionadores (*drivers*) da evolução do câncer. As diferenças nos padrões de MSI entre os tipos de cânceres podem consequentemente refletir diferentes pressões seletivas positivas e negativas observadas durante a carcinogênese.

Assim, exemplifica-se como não apenas a determinação do *status* MSI é importante para o CCR, mas também como esse evento atua nos demais genes tidos como MSI-alvo. A alteração de genes do MMR é a principal causa da MSI e a progressão genética dos tumores que apresentam MSI baseia-se na ocorrência de mutações em oncogenes, genes supressores tumorais, genes apoptóticos e genes de reparo. Trabalhos sugerem que a MSI não atue de modo discreto, mas de modo contínuo, afetando diferentes sítios de microssatélites ao longo do genoma tumoral influenciando na progressão da doença e na sobrevivência do paciente^{40, 43}. Visto que em diversos estudos, os dados de alteração nesses genes divergiram substancialmente para casuísticas tão semelhantes clínico-patologicamente, nossos resultados sugerem que a heterogeneidade clínica em pacientes com CCR é devido ao perfil de genes MSI-alvo alterados em cada tumor, conferindo resistência/sensibilidade ao tratamento e melhor/pior prognóstico da doença.

Apesar da classificação em tumores MSS, MSI-L e MSI-H, o número de eventos MSI e as características relacionadas a eles são úteis na avaliação e progressão do câncer^{147, 148}. Em recente e relevante estudo de Kim et al.⁴⁰, analisando por meio de técnicas de bioinformática e utilizando dados genômicos do TCGA de CCR e de câncer de endométrio (CE), constatou-se que casos MSI-H apresentam um elevado número de eventos MSI (mediana de 290 eventos no CCR e 126 no CE) quando comparado aos MSI-L (mediana de 5 e 2) e aos MSS (mediana de 4 e 1)⁴⁰. Sabe-se ainda, que os genomas do CCR e CE apresentam um nível considerável de especificidade tumoral nos genes MSI-alvo alterados⁴⁰.

Para o estudo dos potenciais genes MSI-alvo do presente trabalho, selecionamos genes MSI-alvo previamente descritos como relevantes e podemos destacar as elevadas porcentagens de casos alterados para os genes: *HSP110*, *ATM*, *EGFR*, *MRE11*, *ROCK1* e

TGFBRII, as baixas porcentagens para: *RAD50*, *MSH6*, *ABCC5*, *PTEN*, *BLM*, *WISP3* e *TRBP2* e ausência de alteração em *BRCA1*, *BRCA2*, *XPO5* e *XRCC2*. Em Kim et al.¹⁴⁹, um dos primeiros trabalhos analisando genes MSI-alvo, os valores encontrados foram: *RAD50* (33%), *BLM* (18%), *MSH6* (23%), *BRCA1* (3%) e *ATM* (3%). Em comparação, todos os valores do presente trabalho foram inferiores, menos para *ATM*, se mostrando o segundo gene MSI-alvo mais frequentemente alterado nas amostras analisadas e ainda um importante alvo nestes tumores com MSI. Comparativamente ao trabalho de Dorard et al.¹⁴⁶ temos uma frequência de alteração semelhante apenas para *HSP110* (~90%) e para os outros genes MSI-alvo os valores são superiores em até 10 vezes em relação ao presente trabalho¹⁴⁶. Com os dados obtidos por Collura et al.⁵⁸, temos também uma porcentagem semelhante apenas para *HSP110* (97%) e para os demais genes MSI-alvo, observam-se novamente valores maiores em até 7 vezes em relação ao presente trabalho⁵⁸. No trabalho de Markovic et al.⁵⁷, demonstrou-se alteração no *HSP110* em 100% dos casos MSI-H analisados e ainda, alguns casos apresentaram associação com mutação em *BRAF*⁵⁷. É importante citar que as diferenças encontradas pelos trabalhos analisados podem ocorrer por diversos motivos, desde questões metodológicas (técnica ou equipamento utilizado para análise de fragmento, quantidade de regiões de microssatélite analisadas por gene) até questões amostrais (critérios seletivos de amostras, número amostral e heterogeneidade amostral). O presente trabalho foi o primeiro a se propor a realizar tal análise com uma amostragem tão representativa e composta de casos da população brasileira.

Dos 24 genes MSI-alvo analisados por nós, o *HSP110* se mostrou o mais frequentemente alterado (92,9%) no presente trabalho e em outros da literatura, colocando-o como um novo gene MSI-alvo tanto em linhagens celulares quanto em tumores primários de CCR com MSI¹⁴⁶. Este gene, assim como outros *Heat shock proteins* (HSP), atua protegendo as células contra condições adversas, como um fator de troca nucleotídica para *HSP70*¹⁵⁰ e como uma importante chaperona¹⁵¹. Graças a essa atividade, a *HSP110* é uma boa carreadora de antígenos e é usada como uma proteína extracelular na formulação de vacinas^{152, 153}. De maneira não totalmente compreendida, a sua propriedade tumorigênica no CCR, deve-se a uma superexpressão que atua evitando a morte celular apoptótica¹⁵⁴. Recentemente, o estudo de Buhard et al.¹⁵⁵ sugeriu o uso desse gene como um complemento do painel de detecção de MSI, visto que ele sozinho apresentou uma maior sensibilidade em comparação ao painel e uma similar especificidade. O uso do *HSP110*

simplificaria e melhoraria o método molecular de detecção de MSI em CCR, inclusive em casos duvidosos para o painel *pentaplex*.

Outro gene MSI-alvo analisado pelo presente trabalho e que se apresentou alterado na maioria dos casos (58,1%) foi o *TGFBRII*. A inativação da sinalização por *TGFB* é um dos passos na progressão do CCR e cerca de um-terço dos casos apresentam mutações inativadoras em *TGFBRII*³⁴. Em tumores com MSI a sua mutação ocorre devido a alterações no microsatélite contido na sua região codificadora em 69-90% dos casos^{156, 157}. Este valor é próximo do relatado pelo presente trabalho. Relatou-se também um possível papel preditivo de prognóstico para *TGFBRII* ao se observar que pacientes com CCR estadio III, MSI-H e com mutação em *TGFB* tratados com quimioterapia baseada em 5-FU apresentaram um melhor prognóstico^{136, 158}.

Analizamos também a sobrevivência dos pacientes estratificada para a função gênica desempenhada por esses genes MSI-alvo e quanto ao *status* MSI. Observamos diferença estatisticamente significativa entre as curvas de sobrevivência para os genes MSI-alvo envolvidos com as funções gênicas: Sinalização celular, Receptor tirosina cinase e Adesão/Citoesqueleto. Os casos MSI-H com genes MSI-alvo alterados ligados a essas funções gênicas apresentaram uma maior probabilidade para 5 anos quando comparados com os casos MSS+MSI-L. De um modo geral, essas funções gênicas são cruciais para o desenvolvimento/progressão dos tumores, genes presentes nelas foram utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos que contribuem para uma melhor resposta e sobrevida dos pacientes e dados acerca de alterações nessas vias são importantes para a orientação na conduta clínica, o que demonstra a presença e importância da heterogeneidade genética dentre os casos MSI.

5.6 Proporção de ancestralidades dos pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos e sua influência sobre *status* de MSI

A heterogeneidade genética da população brasileira é fruto de interrelações étnicas, sendo os principais grupos contribuintes os Ameríndios (grupos populacionais nativos das Américas), os Europeus (colonizadores) e os Africanos (mão-de-obra escrava). Além disso, certas regiões do país receberam outros grupos populacionais na recente história do país, como italianos e alemães na região Sul e japoneses e árabes na região Sudeste. Com mais de cinco séculos de história, os brasileiros apresentam diversos padrões de ancestralidade

genética que englobam todo o território do país^{95, 159}. A avaliação da miscigenação se faz importante nos estudos genéticos populacionais, principalmente na abordagem de grupos altamente miscigenados, como o Brasil e os diversos países do continente americano.

No presente trabalho, determinamos as proporções de ancestralidade Africana (AFR), Europeia (EUR), Asiática (ASN) e Ameríndia (AME) para os pacientes brasileiros, por meio do painel de marcadores AIMs (*Ancestry-informative Markers*)¹⁰⁶. Na visão geral, temos um predomínio do componente EUR (73,9%), seguido do AFR (12,6%) e um equilíbrio entre as proporções dos componentes ASN (6,8%) e AME (6,7%). Esses dados elucidam a forte influência europeia na composição genética dos pacientes analisados pelo presente trabalho e como essa carga genética é importante no fenótipo populacional. Também encontramos que a proporção do componente africano foi o segundo mais frequente, sendo aproximadamente a soma dos componentes ASN e AME. Esse predomínio do componente europeu na proporção do grupo CCR Brasil foi semelhante a descrita para a população saudável brasileira das regiões Norte, Nordeste, Sul e Sudeste⁹⁵. Neste estudo de Pena et al.⁹⁵ foi evidenciada uma pequena variabilidade ancestral entre as diferentes regiões do país, exemplificado pelo componente europeu que apresentou uma uniformidade entre as regiões (Norte-69,7%, Nordeste-60,6%, Sudeste-73,7% e Sul-77,7%). Os nossos dados foram também semelhantes ao reportado por Manta et al.¹⁶⁰, que analisaram casos provenientes da cidade do Rio de Janeiro (região Sudeste do Brasil) utilizando a mesma metodologia empregada pelo presente trabalho. Neste trabalho os indivíduos também apresentaram padrões variáveis de miscigenação resultando em uma população global com ancestralidade predominantemente europeia (55,2%), seguida de africana (31,1%) e de ameríndia (13,7%)¹⁶⁰. As proporções de ancestralidade do trabalho de Manta et al.¹⁶⁰ e do presente trabalho não são idênticas, mas ambas demonstram um predomínio do componente europeu seguido do africano. Embora, para a população do Rio de Janeiro, o componente africano (31,1%) foi aproximadamente duas vezes superior ao encontrado pelo presente trabalho (12,6%). Ampliando os achados anteriores, Manta et al.¹⁶¹ analisaram 14 populações de diferentes regiões geográficas brasileiras e apresentaram resultados semelhantes ao do presente trabalho, com relação as proporções dos componentes ancestrais. Mais especificamente, nossos dados foram corroborados quando comparados com os dados das populações analisadas da região Sudeste, demonstrando que a ancestralidade europeia foi a mais frequente, seguida da africana. No estudo de Kehdy et

al⁹¹, três grupos amostrais foram analisados representando a região Nordeste, a Sudeste e a Sul. Neste trabalho o componente africano foi o mais frequente nas amostras do Nordeste e o europeu nas outras regiões, corroborando, como observado pelo presente trabalho, o predomínio do componente europeu na população brasileira.

De um modo geral, a literatura e o presente trabalho demonstraram que o componente europeu foi o mais presente em todas as regiões brasileiras, seguido dos componentes africano e ameríndio, nas regiões Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul. Com exceção da região Norte que apresentou o componente ameríndio como o segundo mais frequente. Isto indica que as populações brasileiras são mais semelhantes ancestralmente do que as características fenotípicas/socioculturais possam divergir, embora em determinadas regiões observemos maiores proporções de determinados grupos ancestrais.

A incidência do CCR na América Latina tem aumentado de modo constante nas últimas décadas, com uma taxa inferior a metade da observada na América do Norte em pacientes afro-americanos e de origem caucasiana¹⁶². Tais taxas variam largamente entre os continentes, sendo as mais altas nos países com populações principalmente caucasianas. Essas diferenças, e a recente tendência de aumento observada nos países em desenvolvimento, foram atribuídas à alta prevalência de fatores de risco, como obesidade, sedentarismo e mais recentemente, a variação na susceptibilidade genética entre as populações de diferentes origens étnicas^{163, 164}.

No nosso estudo observamos que as frequências dos componentes de ancestralidade para cada *status* MSI foram semelhantes, com a ancestralidade EUR se destacando como a mais frequente, seguida da AFR e um equilíbrio entre as proporções dos componentes ASN e AME. Após análises univariadas, constatamos que não houve associação entre os *status* MSI e as ancestralidades analisadas.

Após nossa análise multivariada com *status* de MSI como desfecho, podemos inferir indiretamente que o aumento na proporção de ancestralidade asiática (ASN) está associada com a redução na chance de ser MSI-H e o aumento na ancestralidade africana (AFR) com o aumento da chance de ser MSI-H. Isso destaca como o componente ancestral numa população miscigenada como a brasileira, se faz importante para a atribuição de fatores prognóstico e preditivos de tratamento. De modo semelhante ao observado no nosso estudo, mas não especificamente em relação ao *status* MSI no CCR, o trabalho de Hernandez-Suarez et al.¹⁶⁵ ao analisar pacientes colombianos, demonstrou que ao se

comparar com os casos controles, os casos apresentando adenocarcinomas possuíam uma maior proporção AFR, os apresentando apenas adenomas possuíam uma maior proporção de EUR e que nenhuma ancestralidade apresentou associação com a localização tumoral (cólon proximal ou distal). Em resumo, o componente africano contribui para a susceptibilidade ao CCR na população colombiana¹⁶⁵. Ao compararmos nossos dados com os de Yoon et al.⁹⁰, corroboramos nossos achados a cerca da menor chance de serem MSI-H os pacientes com maior componente ancestral ASN e observamos que não foi encontrada diferença na frequência de casos com MSI entre os pacientes de origem africana e de origem europeia⁹⁰. No entanto, diferentemente do observado no presente trabalho, Xicola et al.⁸³ estudando a população americana, não encontraram diferença significativa na porcentagem de casos MSI-H entre pacientes afro-americanos e pacientes brancos não-hispânicos e ainda, que não houve diferença nas frequências de MSI nos casos com tumores localizados no cólon proximal entre os dois grupos étnicos.

Os dados do presente trabalho permitiram a elucidação da composição ancestral genética dos pacientes CCR brasileiros, demonstrando o predomínio do componente EUR na população e a não associação destes componentes com os *status* MSI no CCR. Com esses resultados podemos ainda: compreender que no nível genético a ancestralidade dos pacientes analisados com diferente *status* MSI foi uniforme e melhorar a percepção da diversidade populacional brasileira. Assim, o presente trabalho junto com a literatura da área, demonstrou associação entre a ancestralidade genética e o CCR em uma população miscigenada, evidenciando a influência da ancestralidade sobre o risco de câncer em tais populações.

5.7 Características associadas a sobrevivência em pacientes com CCR do Hospital de Câncer de Barretos

O CCR é um dos mais comuns na sociedade ocidental com até 50-70% dos casos desenvolvendo doença metastática¹⁶⁶. Com os avanços cirúrgicos, o surgimento dos medicamentos de nova geração e a implementação dos programas de rastreios, a sobrevivência dos casos diagnosticados precocemente vem aumentando, principalmente nos países desenvolvidos, embora nos países em desenvolvimento (Brasil) os índices não estejam satisfatórios¹⁶⁷.

As análises de sobrevivência global (SG) da presente série evidenciou uma probabilidade de sobrevivência para os pacientes estimada de 93% em 1 ano, de 72% em 3 anos e de 49% em 5 anos, com uma sobrevivência global mediana de 56 meses (IC95%: 47-65). Nossa SG mediana foi superior ao encontrado pelo trabalho de *American Cancer Society*¹⁶⁸ que obteve mediana de 24-27 meses e superior também ao de Nam et al.¹¹⁴ que observaram mediana de 38 meses, embora ambos os trabalhos envolvessem casos de CCR avançado.

Quando estratificamos os casos quanto ao *status* MSI (MSS+MSI-L e MSI-H), não observamos diferença estatisticamente significativa entre as duas curvas, embora a probabilidade de SG em 5 anos foi de 49% para o grupo MSS+MSI-L e de 63% para pacientes com MSI-H. De modo semelhante, não se observou diferença estatística entre as curvas de sobrevivência quando Nam et al.¹¹² analisaram casos de CCR avançado estratificados quanto ao *status* MSI¹¹⁴. Por outro lado, na literatura internacional há relatos de diferenças, como o descrito por Yoon et al.¹³⁰ que demonstraram que os pacientes MSI-H apresentaram maiores taxas de sobrevivência livre de doença e sobrevivência global do que aqueles com MSS¹³⁰. No mesmo trabalho ainda, a taxa de recorrência foi significativamente menor em pacientes MSI-H que em pacientes MSS¹³⁰.

O *status* MSI está frequentemente associado à sobrevida do CCR. Uma meta-análise recente mostrou que o CCR MSI-H estava associado a uma sobrevivência global 40% superior à do CCR MSS¹⁶⁹. Outro estudo com mais de 7 mil casos, reportou que pacientes MSI-H tem um prognóstico significativamente melhor que aqueles com tumores MSS¹⁷⁰. No presente trabalho, foram realizadas análises de sobrevivência estratificando a casuística total em relação ao *status* MSI e comparando determinadas variáveis, tais como, localização tumor primário, idade ao diagnóstico, estadiamento, tipo histológico, grau histológico, *score* 2, uso de quimioterapia e uso de radioterapia. Para os pacientes MSS+MSI-L, obtivemos diferenças estatisticamente significativas entre as curvas para as variáveis: idade ao diagnóstico, estadiamento, tipo histológico, grau histológico e uso de quimioterapia. No grupo de pacientes MSI-H, observamos diferenças significativas entre as curvas para estadiamento e *Score* 2. Apenas a variável estadiamento apresentou diferença significativa entre as curvas em ambos os *status* MSI. Dada a importância que o estadiamento tem como fator prognóstico, estimativas da sobrevivência global estratificada pelo *status* MSI para os estádios 0/I, II, III e IV, foram realizadas. Encontramos somente uma tendência, $p=0,07$, para

o estadiamento II e maiores probabilidades de sobrevivência para pacientes MSS+MSI-L. Estes resultados diferem de alguns estudos que referem que mesmo quando pareados pelo estadiamento, pacientes com MSI-H apresentam um melhor prognóstico que os MSS^{20, 142}. No entanto, este dado não é consensual, e outros estudos não encontraram diferenças quando os pacientes dos estadios II e III foram considerados separados de acordo com a localização do tumor^{130, 134}.

Dada a alta incidência de recorrência seguida a ressecção cirúrgica, tem havido um interesse na estratificação de risco dos pacientes após cirurgia, bem como na seleção de pacientes para terapias neoadjuvantes ou adjuvantes. A estratificação de risco dos pacientes com CCR tem se guiado pela avaliação de várias características clínicas e patológicas¹³⁴. Rotineiramente, o CCR estadiamento I é tratado com cirurgia do tumor. Os pacientes com câncer de reto estadiamento II-III recebem, radioterapia e quimioterapia neoadjuvante com 5-FU ou capecitabina oral, enquanto que os pacientes com câncer de cólon estadiamento III recebem terapia adjuvante (5-FU e oxaliplatina). Embora haja um claro benefício no tratamento adjuvante para o câncer de cólon estadiamento III, aproximadamente um-terço dos pacientes sofrerá recorrência em cinco anos. A utilidade da quimioterapia adjuvante no câncer de cólon estadiamento II permanece controversa, mesmo quando restrita a pacientes com características clínicas de alto risco. O tratamento principal para o CCR em estadiamento IV é a quimioterapia¹⁴². Em ensaio clínico com pacientes com câncer de cólon estadiamento II-III, aqueles que eram MSI-H apresentaram melhor prognóstico, mas não se observou associação entre o *status* MSI e benefícios da quimioterapia, não podendo estabelecer que quimioterapia adjuvante confere uma vantagem clara de sobrevivência aos pacientes com CCR em estadiamento II¹⁷¹.

O tratamento com 5-FU é empregado no combate ao CCR, sendo usado sozinho ou em combinação com outros fármacos. É recomendado como tratamento de primeira linha para estadios III e IV e em casos estadiamento II de alto risco¹⁷². Na literatura, diversos trabalhos vêm tentando elucidar a influência que a MSI tem sobre a resposta a esse fármaco¹⁴² e têm descrito que o *status* MSI não é um biomarcador preditivo de resposta a esse fármaco¹⁷³⁻¹⁷⁵. Não obstante, *guidelines* da *National Comprehensive Cancer Network* recomendam a análise de MSI em todos os pacientes com estadiamento II porque esses podem não se beneficiar do 5-FU caso apresentem MSI¹⁷⁶.

No presente estudo, estimamos a sobrevivência global estratificada pelo *status* MSI e tratamento baseado em 5-FU. Não houve diferença estatisticamente significativa de SG para nenhum dos tratamentos empregados. Estes resultados vão ao encontro dos estudos de Pawlik et al.¹³⁶ e de Webber et al.¹⁷². Webber et al.¹⁷², realizaram uma meta-análise englobando 9212 pacientes tratados ou não com 5-FU e concluiu que o regime terapêutico melhorou a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global, mas o status de MSI não influenciou na resposta ao tratamento.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho constitui a mais profunda e extensa análise da instabilidade de microssatélites em pacientes brasileiros diagnosticados com câncer colorretal. De acordo com os objetivos propostos, dos resultados alcançados e das discussões realizadas, podemos concluir que:

- A análise molecular de MSI foi devidamente padronizada e implementada no Centro de Diagnóstico Molecular do Hospital de Câncer de Barretos para pacientes oncológicos.
- A frequência de 10% de casos CCR com fenótipo MSI encontra-se dentro do intervalo reportado pela literatura internacional. A porcentagem de casos com perda de expressão das proteínas do MMR foi semelhante a encontrada na análise molecular, obtendo-se uma elevada concordância entre as duas metodologias na determinação do *status* de MSI.
- Casos com MSI-H apresentaram alterações em regiões de microssatélite em genes MSI-alvo, sendo que os mais alterados estão relacionados com funções de reparo de DNA, sensor de dano no DNA, *Heat Shock Proteins* e receptores tirosina-cinase.
- A metilação da região promotora de *MLH1* foi o principal evento (72%) de inativação gênica nos casos MSI-H, com perda de expressão de *MLH1*. Entre os MSI-H, 26,4% apresentaram mutação de *BRAF* V600E, sendo inferior ao reportado pela literatura para este subgrupo de pacientes.
- A análise de ancestralidade genética dos pacientes com CCR evidenciou o componente europeu como o mais representativo (74%), seguido do africano (13%). Encontramos também que a ancestralidade africana está associada com o aumento na chance de ser MSI-H e a ancestralidade asiática relaciona-se com a redução na chance de ser MSI-H. Por último, nos casos MSI-H, quanto menor o componente ancestral asiático maior a probabilidade de sobrevivência.
- Pacientes CCR com fenótipo MSI, apresentam tumores preferencialmente no cólon direito e exibem características clínicas associadas a menor agressividade, apesar de não encontrarmos uma diferença significativa na sobrevivência global dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. *Global cancer statistics, 2012*. **CA Cancer J Clin**. 2015;65(2):87-108.
2. WHO. *World health statistics 2012*. World Health Organization 2012.
3. Miller KD, Siegel RL, Lin CC, Mariotto AB, Kramer JL, Rowland JH, et al. *Cancer treatment and survivorship statistics, 2016*. **CA Cancer J Clin**. 2016;66(4):271-89.
4. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. *Cancer Statistics, 2017*. **CA Cancer J Clin**. 2017.
5. Meyerhardt JA, Mayer RJ. *Systemic therapy for colorectal cancer*. **N Engl J Med**. 2005;352(5):476-87.
6. INCA. *Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil Rio de Janeiro: INCA*; 2016. p. 124.
7. Sugai T, Habano W, Jiao YF, Tsukahara M, Takeda Y, Otsuka K, et al. *Analysis of molecular alterations in left- and right-sided colorectal carcinomas reveals distinct pathways of carcinogenesis: proposal for new molecular profile of colorectal carcinomas*. **J Mol Diagn**. 2006;8(2):193-201.
8. Yahagi M, Okabayashi K, Hasegawa H, Tsuruta M, Kitagawa Y. *The Worse Prognosis of Right-Sided Compared with Left-Sided Colon Cancers: a Systematic Review and Meta-analysis*. **J Gastrointest Surg**. 2016;20(3):648-55.
9. Pino MS, Chung DC. *The chromosomal instability pathway in colon cancer*. **Gastroenterology**. 2010;138(6):2059-72.
10. Takahashi Y, Sugai T, Habano W, Ishida K, Eizuka M, Otsuka K, et al. *Molecular differences in the microsatellite stable phenotype between left-sided and right-sided colorectal cancer*. **Int J Cancer**. 2016;139(11):2493-501.
11. Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M. *The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence*. **Int J Cancer**. 2009;125(1):171-80.
12. Slattery ML, Fitzpatrick FA. *Convergence of hormones, inflammation, and energy-related factors: a novel pathway of cancer etiology*. **Cancer Prev Res (Phila)**. 2009;2(11):922-30.
13. Fearon ER. *Molecular genetics of colorectal cancer*. **Annu Rev Pathol**. 2011;6:479-507.
14. Jass JR. *Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features*. **Histopathology**. 2007;50(1):113-30.

15. Itzkowitz SH, Harpaz N. *Diagnosis and management of dysplasia in patients with inflammatory bowel diseases*. **Gastroenterology**. 2004;126(6):1634-48.
16. Rustgi AK. *The genetics of hereditary colon cancer*. **Genes Dev**. 2007;21(20):2525-38.
17. Fearon ER, Vogelstein B. *A genetic model for colorectal tumorigenesis*. **Cell**. 1990;61(5):759-67.
18. Leggett B, Whitehall V. *Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis*. **Gastroenterology**. 2010;138(6):2088-100.
19. Makinen MJ. *Colorectal serrated adenocarcinoma*. **Histopathology**. 2007;50(1):131-50.
20. Laghi L, Malesci A. *Microsatellite instability and therapeutic consequences in colorectal cancer*. **Dig Dis**. 2012;30(3):304-9.
21. Matos P, Goncalves V, Jordan P. *Targeting the serrated pathway of colorectal cancer with mutation in BRAF*. **Biochim Biophys Acta**. 2016;1866(1):51-63.
22. Yamane L, Scapulatempo-Neto C, Reis RM, Guimaraes DP. *Serrated pathway in colorectal carcinogenesis*. **World J Gastroenterol**. 2014;20(10):2634-40.
23. Garcia-Solano J, Perez-Guillermo M, Conesa-Zamora P, Acosta-Ortega J, Trujillo-Santos J, Cerezuela-Fuentes P, et al. *Clinicopathologic study of 85 colorectal serrated adenocarcinomas: further insights into the full recognition of a new subset of colorectal carcinoma*. **Hum Pathol**. 2010;41(10):1359-68.
24. 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.
25. 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.
26. 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.
27. 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.

28. 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.
29. Wilsher MJ. *Adenocarcinoma arising in a traditional serrated adenoma of the rectosigmoid colon with osseous metaplasia. Pathol Int.* 2011;61(4):239-42.
30. Knudson AG, Jr. *Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971;68(4):820-3.
31. Hanahan D, Weinberg RA. *The hallmarks of cancer. Cell.* 2000;100(1):57-70.
32. Hanahan D, Weinberg RA. *Hallmarks of cancer: the next generation. Cell.* 2011;144(5):646-74.
33. Boland CR, Goel A. *Microsatellite instability in colorectal cancer. Gastroenterology.* 2010;138(6):2073-87.e3.
34. Markowitz SD, Bertagnolli MM. *Molecular origins of cancer: Molecular basis of colorectal cancer. N Engl J Med.* 2009;361(25):2449-60.
35. Cancer Genome Atlas N. *Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. Nature.* 2012;487(7407):330-7.
36. Yamamoto E, Suzuki H, Yamano HO, Maruyama R, Nojima M, Kamimae S, et al. *Molecular dissection of premalignant colorectal lesions reveals early onset of the CpG island methylator phenotype. Am J Pathol.* 2012;181(5):1847-61.
37. Jass JR, Whitehall VL, Young J, Leggett BA. *Emerging concepts in colorectal neoplasia. Gastroenterology.* 2002;123(3):862-76.
38. Ogino S, Goel A. *Molecular classification and correlates in colorectal cancer. J Mol Diagn.* 2008;10(1):13-27.
39. Janne PA, Mayer RJ. *Chemoprevention of colorectal cancer. N Engl J Med.* 2000;342(26):1960-8.
40. Kim TM, Laird PW, Park PJ. *The landscape of microsatellite instability in colorectal and endometrial cancer genomes. Cell.* 2013;155(4):858-68.
41. Newton K, Jorgensen NM, Wallace AJ, Buchanan DD, Lalloo F, McMahon RF, et al. *Tumour MLH1 promoter region methylation testing is an effective prescreen for Lynch Syndrome (HNPCC). J Med Genet.* 2014;51(12):789-96.
42. Kim JH, Lee C, Olvera NE, Ellis CD. *The role of landscape spatial patterns on obesity in Hispanic children residing in inner-city neighborhoods. J Phys Act Health.* 2014;11(8):1449-57.

43. Hause RJ, Pritchard CC, Shendure J, Salipante SJ. *Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types*. **Nat Med**. 2016;22(11):1342-50.
44. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Soneson C, et al. *The consensus molecular subtypes of colorectal cancer*. **Nat Med**. 2015;21(11):1350-6.
45. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, et al. *Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors*. **J Clin Oncol**. 2006;24(2):241-51.
46. Vilar E, Gruber SB. *Microsatellite instability in colorectal cancer-the stable evidence*. **Nat Rev Clin Oncol**. 2010;7(3):153-62.
47. Sinicrope FA, Sargent DJ. *Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications*. **Clin Cancer Res**. 2012;18(6):1506-12.
48. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, et al. *Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability*. **J Natl Cancer Inst**. 2004;96(4):261-8.
49. Li X, Yao X, Wang Y, Hu F, Wang F, Jiang L, et al. *MLH1 promoter methylation frequency in colorectal cancer patients and related clinicopathological and molecular features*. **PLoS One**. 2013;8(3):e59064.
50. M Mirchev IK, P Kahl, R Buttner, L Angelova, B Manevska, T Kadyiska. *EPIGENETIC SILENCING OF MLH1 AND p16INK AND THEIR RELATION TO CERTAIN CLINICO-PATHOLOGICAL FEATURES IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER*. **Journal of IMAB - Annual Proceeding (Scientific Papers)**. 2007;book 1.
51. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, et al. *A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer*. **Cancer Res**. 1998;58(22):5248-57.
52. Suraweera N, Duval A, Reperant M, Vaury C, Furlan D, Leroy K, et al. *Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR*. **Gastroenterology**. 2002;123(6):1804-11.
53. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. *An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers*. **PLoS One**. 2010;5(2):e9393.
54. de la Chapelle A, Hampel H. *Clinical relevance of microsatellite instability in colorectal cancer*. **J Clin Oncol**. 2010;28(20):3380-7.

55. Shima K, Morikawa T, Yamauchi M, Kuchiba A, Imamura Y, Liao X, et al. *TGFBR2 and BAX mononucleotide tract mutations, microsatellite instability, and prognosis in 1072 colorectal cancers.* **PLoS One.** 2011;6(9):e25062.
56. Sinicrope FA, Rego RL, Foster N, Sargent DJ, Windschitl HE, Burgart LJ, et al. *Microsatellite instability accounts for tumor site-related differences in clinicopathologic variables and prognosis in human colon cancers.* **Am J Gastroenterol.** 2006;101(12):2818-25.
57. Markovic S, Antic J, Dimitrijevic I, Zogovic B, Bojic D, Svorcan P, et al. *Microsatellite instability affecting the T17 repeats in intron 8 of HSP110, as well as five mononucleotide repeats in patients with colorectal carcinoma.* **Biomark Med.** 2013;7(4):613-21.
58. Collura A, Lagrange A, Svrcek M, Marisa L, Buhard O, Guilloix A, et al. *Patients with colorectal tumors with microsatellite instability and large deletions in HSP110 T17 have improved response to 5-fluorouracil-based chemotherapy.* **Gastroenterology.** 2014;146(2):401-11 e1.
59. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, et al. *PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency.* **N Engl J Med.** 2015;372(26):2509-20.
60. 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.** 2012;23(10):2479-516.
61. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. *Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications.* **Clin Genet.** 2009;76(1):1-18.
62. Lynch HT, Snyder CL, Shaw TG, Heinen CD, Hitchins MP. *Milestones of Lynch syndrome: 1895-2015.* **Nat Rev Cancer.** 2015;15(3):181-94.
63. Cini G, Carnevali I, Quaia M, Chiaravalli AM, Sala P, Giacomini E, et al. *Concomitant mutation and epimutation of the MLH1 gene in a Lynch syndrome family.* **Carcinogenesis.** 2015;36(4):452-8.
64. Park JG, Kim DW, Hong CW, Nam BH, Shin YK, Hong SH, et al. *Germ line mutations of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients with small bowel cancer: International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Collaborative Study.* **Clin Cancer Res.** 2006;12(11 Pt 1):3389-93.
65. Vasen HF, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. *Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer).* **J Med Genet.** 2007;44(6):353-62.
66. Julie C, Tresallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mitry E, et al. *Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer):*

revised Bethesda guidelines-based approach versus molecular screening. **Am J Gastroenterol.** 2008;103(11):2825-35; quiz 36.

67. van Lier MG, Leenen CH, Wagner A, Ramsoekh D, Dubbink HJ, van den Ouweland AM, et al. *Yield of routine molecular analyses in colorectal cancer patients ≤ 70 years to detect underlying Lynch syndrome.* **J Pathol.** 2012;226(5):764-74.

68. Perez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Paya A, Brea A, et al. *Comparison between universal molecular screening for Lynch syndrome and revised Bethesda guidelines in a large population-based cohort of patients with colorectal cancer.* **Gut.** 2012;61(6):865-72.

69. Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. *Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts.* **Gut.** 2013;62(6):812-23.

70. Syngal S, Fox EA, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. *Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1.* **J Med Genet.** 2000;37(9):641-5.

71. Rotimi CN, Jorde LB. *Ancestry and disease in the age of genomic medicine.* **N Engl J Med.** 2010;363(16):1551-8.

72. Jorde LB, Watkins WS, Bamshad MJ, Dixon ME, Ricker CE, Seielstad MT, et al. *The distribution of human genetic diversity: a comparison of mitochondrial, autosomal, and Y-chromosome data.* **Am J Hum Genet.** 2000;66(3):979-88.

73. Li JZ, Absher DM, Tang H, Southwick AM, Casto AM, Ramachandran S, et al. *Worldwide human relationships inferred from genome-wide patterns of variation.* **Science.** 2008;319(5866):1100-4.

74. Jakobsson M, Scholz SW, Scheet P, Gibbs JR, VanLiere JM, Fung HC, et al. *Genotype, haplotype and copy-number variation in worldwide human populations.* **Nature.** 2008;451(7181):998-1003.

75. Conrad DF, Jakobsson M, Coop G, Wen X, Wall JD, Rosenberg NA, et al. *A worldwide survey of haplotype variation and linkage disequilibrium in the human genome.* **Nat Genet.** 2006;38(11):1251-60.

76. Novembre J, Johnson T, Bryc K, Kutalik Z, Boyko AR, Auton A, et al. *Genes mirror geography within Europe.* **Nature.** 2008;456(7218):98-101.

77. Reich D, Thangaraj K, Patterson N, Price AL, Singh L. *Reconstructing Indian population history.* **Nature.** 2009;461(7263):489-94.

78. Kosoy R, Nassir R, Tian C, White PA, Butler LM, Silva G, et al. *Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America*. **Hum Mutat**. 2009;30(1):69-78.
79. Tishkoff SA, Reed FA, Friedlaender FR, Ehret C, Ranciaro A, Froment A, et al. *The genetic structure and history of Africans and African Americans*. **Science**. 2009;324(5930):1035-44.
80. Halder I, Yang BZ, Kranzler HR, Stein MB, Shriver MD, Gelernter J. *Measurement of admixture proportions and description of admixture structure in different U.S. populations*. **Hum Mutat**. 2009;30(9):1299-309.
81. Bryc K, Auton A, Nelson MR, Oksenberg JR, Hauser SL, Williams S, et al. *Genome-wide patterns of population structure and admixture in West Africans and African Americans*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2010;107(2):786-91.
82. Shriver MD, Parra EJ, Dios S, Bonilla C, Norton H, Jovel C, et al. *Skin pigmentation, biogeographical ancestry and admixture mapping*. **Hum Genet**. 2003;112(4):387-99.
83. Xicola RM, Gagnon M, Clark JR, Carroll T, Gao W, Fernandez C, et al. *Excess of proximal microsatellite-stable colorectal cancer in African Americans from a multiethnic study*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(18):4962-70.
84. You YN, Xing Y, Feig BW, Chang GJ, Cormier JN. *Young-onset colorectal cancer: is it time to pay attention?* **Arch Intern Med**. 2012;172(3):287-9.
85. You YN. *Risk factors for young-onset advanced colorectal cancer-reply*. **Arch Intern Med**. 2012;172(12):971-2.
86. Rex DK, Johnson DA, Anderson JC, Schoenfeld PS, Burke CA, Inadomi JM, et al. *American College of Gastroenterology guidelines for colorectal cancer screening 2009 [corrected]*. **Am J Gastroenterol**. 2009;104(3):739-50.
87. Sanoff HK, Sargent DJ, Green EM, McLeod HL, Goldberg RM. *Racial differences in advanced colorectal cancer outcomes and pharmacogenetics: a subgroup analysis of a large randomized clinical trial*. **J Clin Oncol**. 2009;27(25):4109-15.
88. Thornton JG, Morris AM, Thornton JD, Flowers CR, McCashland TM. *Racial variation in colorectal polyp and tumor location*. **J Natl Med Assoc**. 2007;99(7):723-8.
89. Ashktorab H, Smoot DT, Farzanmehr H, Fidelia-Lambert M, Momen B, Hyland L, et al. *Clinicopathological features and microsatellite instability (MSI) in colorectal cancers from African Americans*. **Int J Cancer**. 2005;116(6):914-9.
90. Yoon HH, Shi Q, Alberts SR, Goldberg RM, Thibodeau SN, Sargent DJ, et al. *Racial Differences in BRAF/KRAS Mutation Rates and Survival in Stage III Colon Cancer Patients*. **J Natl Cancer Inst**. 2015;107(10).

91. Kehdy FS, Gouveia MH, Machado M, Magalhaes WC, Horimoto AR, Horta BL, et al. *Origin and dynamics of admixture in Brazilians and its effect on the pattern of deleterious mutations*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2015;112(28):8696-701.
92. Lima-Costa MF, Rodrigues LC, Barreto ML, Gouveia M, Horta BL, Mambrini J, et al. *Genomic ancestry and ethnoracial self-classification based on 5,871 community-dwelling Brazilians (The Epigen Initiative)*. **Sci Rep**. 2015;5:9812.
93. Risch N, Choudhry S, Via M, Basu A, Sebro R, Eng C, et al. *Ancestry-related assortative mating in Latino populations*. **Genome Biol**. 2009;10(11):R132.
94. Telles EE. *Race in Another America: The Significance of Skin Color in Brazil*. **Princeton University Press**; 2006. 336 p.
95. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. *The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected*. **PLoS One**. 2011;6(2):e17063.
96. Durso DF, Bydlowski SP, Hutz MH, Suarez-Kurtz G, Magalhaes TR, Pena SD. *Association of genetic variants with self-assessed color categories in Brazilians*. **PLoS One**. 2014;9(1):e83926.
97. Ruiz-Linares A, Adhikari K, Acuna-Alonzo V, Quinto-Sanchez M, Jaramillo C, Arias W, et al. *Admixture in Latin America: geographic structure, phenotypic diversity and self-perception of ancestry based on 7,342 individuals*. **PLoS Genet**. 2014;10(9):e1004572.
98. Magalhaes da Silva T, Sandhya Rani MR, de Oliveira Costa GN, Figueiredo MA, Melo PS, Nascimento JF, et al. *The correlation between ancestry and color in two cities of Northeast Brazil with contrasting ethnic compositions*. **Eur J Hum Genet**. 2015;23(7):984-9.
99. Alves-Silva J, da Silva Santos M, Guimaraes PE, Ferreira AC, Bandelt HJ, Pena SD, et al. *The ancestry of Brazilian mtDNA lineages*. **Am J Hum Genet**. 2000;67(2):444-61.
100. Pena SD, Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR, Bydlowski SP. *DNA tests probe the genomic ancestry of Brazilians*. **Braz J Med Biol Res**. 2009;42(10):870-6.
101. Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, Antunes CM, Pena SD. *Color and genomic ancestry in Brazilians*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003;100(1):177-82.
102. Pimenta JR, Zuccherato LW, Debes AA, Maselli L, Soares RP, Moura-Neto RS, et al. *Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites*. **Hum Hered**. 2006;62(4):190-5.
103. Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araújo B, Seruca R, Pimentel J, et al. *Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma*. **Neuro Oncol**. 2009;11(5):458-67.

104. 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.
105. Yamane LS, Scapulatempo-Neto C, Alvarenga L, Oliveira CZ, Berardinelli GN, Almodova E, et al. *KRAS and BRAF mutations and MSI status in precursor lesions of colorectal cancer detected by colonoscopy*. **Oncol Rep**. 2014;32(4):1419-26.
106. Pereira R, Phillips C, Pinto N, Santos C, dos Santos SE, Amorim A, et al. *Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing*. **PLoS One**. 2012;7(1):e29684.
107. Campanella NC, Berardinelli GN, Scapulatempo-Neto C, Viana D, Palmero EI, Pereira R, et al. *Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers*. **Eur J Hum Genet**. 2014;22(7):875-80.
108. Verdinelli MA. *Análise inercial em ecologia*. Universidade de São Paulo, São Paulo: Universidade de São Paulo; 1980.
109. Leite SM, Gomes KB, Pardini VC, Ferreira AC, Oliveira VC, Cruz GM. *Assessment of microsatellite instability in colorectal cancer patients from Brazil*. **Mol Biol Rep**. 2010;37(1):375-80.
110. Ferreira CG, Aran V, Zalcborg-Renault I, Victorino AP, Salem JH, Bonamino MH, et al. *KRAS mutations: variable incidences in a Brazilian cohort of 8,234 metastatic colorectal cancer patients*. **BMC Gastroenterol**. 2014;14:73.
111. Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Leitao CN, et al. *Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with the mutator phenotype*. **J Pathol**. 2000;191(4):355-60.
112. Simons CC, Hughes LA, Smits KM, Khalid-de Bakker CA, de Bruine AP, Carvalho B, et al. *A novel classification of colorectal tumors based on microsatellite instability, the CpG island methylator phenotype and chromosomal instability: implications for prognosis*. **Ann Oncol**. 2013;24(8):2048-56.
113. Gonsalves WI, Mahoney MR, Sargent DJ, Nelson GD, Alberts SR, Sinicrope FA, et al. *Patient and tumor characteristics and BRAF and KRAS mutations in colon cancer, NCCTG/Alliance N0147*. **J Natl Cancer Inst**. 2014;106(7).
114. Nam SK, Yun S, Koh J, Kwak Y, Seo AN, Park KU, et al. *BRAF, PIK3CA, and HER2 Oncogenic Alterations According to KRAS Mutation Status in Advanced Colorectal Cancers with Distant Metastasis*. **PLoS One**. 2016;11(3):e0151865.
115. Lech G, Slotwinski R, Krasnodebski IW. *The role of tumor markers and biomarkers in colorectal cancer*. **Neoplasma**. 2014;61(1):1-8.

116. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. *Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer)*. **N Engl J Med**. 2005;352(18):1851-60.
117. Pinol V, Castells A, Andreu M, Castellvi-Bel S, Alenda C, Llor X, et al. *Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer*. **JAMA**. 2005;293(16):1986-94.
118. Zhang L. *Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing*. **J Mol Diagn**. 2008;10(4):301-7.
119. Lin CH, Lin JK, Chang SC, Chang YH, Chang HM, Liu JH, et al. *Molecular profile and copy number analysis of sporadic colorectal cancer in Taiwan*. **J Biomed Sci**. 2011;18:36.
120. Xicola RM, Llor X, Pons E, Castells A, Alenda C, Pinol V, et al. *Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors*. **J Natl Cancer Inst**. 2007;99(3):244-52.
121. Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X. *A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA*. **Diagn Mol Pathol**. 2012;21(3):127-33.
122. Murphy KM, Zhang S, Geiger T, Hafez MJ, Bacher J, Berg KD, et al. *Comparison of the microsatellite instability analysis system and the Bethesda panel for the determination of microsatellite instability in colorectal cancers*. **J Mol Diagn**. 2006;8(3):305-11.
123. Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. *Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer*. **Curr Treat Options Oncol**. 2015;16(7):348.
124. Merok MA, Ahlquist T, Royrvik EC, Tufteland KF, Hektoen M, Sjo OH, et al. *Microsatellite instability has a positive prognostic impact on stage II colorectal cancer after complete resection: results from a large, consecutive Norwegian series*. **Ann Oncol**. 2013;24(5):1274-82.
125. Venderbosch S, Nagtegaal ID, Maughan TS, Smith CG, Cheadle JP, Fisher D, et al. *Mismatch repair status and BRAF mutation status in metastatic colorectal cancer patients: a pooled analysis of the CAIRO, CAIRO2, COIN, and FOCUS studies*. **Clin Cancer Res**. 2014;20(20):5322-30.
126. Hoffmeister M, Blaker H, Kloor M, Roth W, Toth C, Herpel E, et al. *Body mass index and microsatellite instability in colorectal cancer: a population-based study*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2013;22(12):2303-11.

127. Kim SJ, Kim HR, Kim SH, Han JH, Cho YB, Yun SH, et al. *hMLH1 promoter methylation and BRAF mutations in high-frequency microsatellite instability colorectal cancers not fulfilling the revised Bethesda guidelines*. **Ann Surg Treat Res**. 2014;87(3):123-30.
128. Miwata T, Hiyama T, Quach DT, Le HM, Hua HN, Oka S, et al. *Differences in K-ras and mitochondrial DNA mutations and microsatellite instability between colorectal cancers of Vietnamese and Japanese patients*. **BMC Gastroenterol**. 2014;14:203.
129. Krivokapić Z, Marković S, Antić J, Dimitrijević I, Bojić D, Svorcan P, et al. *Clinical and pathological tools for identifying microsatellite instability in colorectal cancer*. **Croat Med J**. 2012;53(4):328-35.
130. Yoon YS, Yu CS, Kim TW, Kim JH, Jang SJ, Cho DH, et al. *Mismatch repair status in sporadic colorectal cancer: immunohistochemistry and microsatellite instability analyses*. **J Gastroenterol Hepatol**. 2011;26(12):1733-9.
131. Søreide K. *High-fidelity of five quasimonomorphic mononucleotide repeats to high-frequency microsatellite instability distribution in early-stage adenocarcinoma of the colon*. **Anticancer Res**. 2011;31(3):967-71.
132. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. *Colorectal carcinoma: Pathologic aspects*. **J Gastrointest Oncol**. 2012;3(3):153-73.
133. Vilar E, Tabernero J. *Molecular dissection of microsatellite instable colorectal cancer*. **Cancer Discov**. 2013;3(5):502-11.
134. Ronnekleiv-Kelly SM, Burkhart RA, Pawlik TM. *Molecular markers of prognosis and therapeutic targets in metastatic colorectal cancer*. **Surg Oncol**. 2016;25(3):190-9.
135. Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN, Marsoni S, Monges G, Labianca R, et al. *DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy*. **J Natl Cancer Inst**. 2011;103(11):863-75.
136. Pawlik TM, Raut CP, Rodriguez-Bigas MA. *Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L*. **Dis Markers**. 2004;20(4-5):199-206.
137. De Roock W, De Vriendt V, Normanno N, Ciardiello F, Tejpar S. *KRAS, BRAF, PIK3CA, and PTEN mutations: implications for targeted therapies in metastatic colorectal cancer*. **Lancet Oncol**. 2011;12(6):594-603.
138. Phipps AI, Buchanan DD, Makar KW, Burnett-Hartman AN, Coghill AE, Passarelli MN, et al. *BRAF mutation status and survival after colorectal cancer diagnosis according to patient and tumor characteristics*. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2012;21(10):1792-8.
139. Goldstein J, Tran B, Ensor J, Gibbs P, Wong HL, Wong SF, et al. *Multicenter retrospective analysis of metastatic colorectal cancer (CRC) with high-level microsatellite instability (MSI-H)*. **Ann Oncol**. 2014;25(5):1032-8.

140. Tie J, Desai J. *Targeting BRAF mutant metastatic colorectal cancer: clinical implications and emerging therapeutic strategies*. **Target Oncol**. 2015;10(2):179-88.
141. de Cuba EM, Snaebjornsson P, Heideman DA, van Grieken NC, Bosch LJ, Fijneman RJ, et al. *Prognostic value of BRAF and KRAS mutation status in stage II and III microsatellite instable colon cancers*. **Int J Cancer**. 2016;138(5):1139-45.
142. Kocarnik JM, Shiovitz S, Phipps AI. *Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications*. **Gastroenterol Rep (Oxf)**. 2015;3(4):269-76.
143. Hughes LA, Khalid-de Bakker CA, Smits KM, van den Brandt PA, Jonkers D, Ahuja N, et al. *The CpG island methylator phenotype in colorectal cancer: progress and problems*. **Biochim Biophys Acta**. 2012;1825(1):77-85.
144. Han SW, Lee HJ, Bae JM, Cho NY, Lee KH, Kim TY, et al. *Methylation and microsatellite status and recurrence following adjuvant FOLFOX in colorectal cancer*. **Int J Cancer**. 2013;132(9):2209-16.
145. Sonay TB, Koletou M, Wagner A. *A survey of tandem repeat instabilities and associated gene expression changes in 35 colorectal cancers*. **BMC Genomics**. 2015;16:702.
146. Dorard C, de Thonel A, Collura A, Marisa L, Svrcek M, Lagrange A, et al. *Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis*. **Nat Med**. 2011;17(10):1283-9.
147. Shlien A, Campbell BB, de Borja R, Alexandrov LB, Merico D, Wedge D, et al. *Combined hereditary and somatic mutations of replication error repair genes result in rapid onset of ultra-hypermutated cancers*. **Nat Genet**. 2015;47(3):257-62.
148. Tsao JL, Yatabe Y, Salovaara R, Jarvinen HJ, Mecklin JP, Aaltonen LA, et al. *Genetic reconstruction of individual colorectal tumor histories*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2000;97(3):1236-41.
149. Kim NG, Choi YR, Baek MJ, Kim YH, Kang H, Kim NK, et al. *Frameshift mutations at coding mononucleotide repeats of the hRAD50 gene in gastrointestinal carcinomas with microsatellite instability*. **Cancer Res**. 2001;61(1):36-8.
150. Andreasson C, Fiaux J, Rampelt H, Druffel-Augustin S, Bukau B. *Insights into the structural dynamics of the Hsp110-Hsp70 interaction reveal the mechanism for nucleotide exchange activity*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2008;105(43):16519-24.
151. Wang XY, Chen X, Manjili MH, Repasky E, Henderson R, Subject JR. *Targeted immunotherapy using reconstituted chaperone complexes of heat shock protein 110 and melanoma-associated antigen gp100*. **Cancer Res**. 2003;63(10):2553-60.

152. Manjili MH, Henderson R, Wang XY, Chen X, Li Y, Repasky E, et al. *Development of a recombinant HSP110-HER-2/neu vaccine using the chaperoning properties of HSP110.* **Cancer Res.** 2002;62(6):1737-42.
153. Manjili MH, Wang XY, Chen X, Martin T, Repasky EA, Henderson R, et al. *HSP110-HER2/neu chaperone complex vaccine induces protective immunity against spontaneous mammary tumors in HER-2/neu transgenic mice.* **J Immunol.** 2003;171(8):4054-61.
154. Ceballos E, Munoz-Alonso MJ, Berwanger B, Acosta JC, Hernandez R, Krause M, et al. *Inhibitory effect of c-Myc on p53-induced apoptosis in leukemia cells. Microarray analysis reveals defective induction of p53 target genes and upregulation of chaperone genes.* **Oncogene.** 2005;24(28):4559-71.
155. Buhard O, Lagrange A, Guilloux A, Colas C, Chouchene M, Wanherdrick K, et al. *HSP110 T17 simplifies and improves the microsatellite instability testing in patients with colorectal cancer.* **J Med Genet.** 2016;53(6):377-84.
156. M. GW, D. MS. *TGF- β Signaling Pathway and Tumor Supression.* In: Derynck RM, K., editor. *The TGF- β family.* **Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press;** 2008. p. 889 - 938.
157. Tsang AH, Cheng KH, Wong AS, Ng SS, Ma BB, Chan CM, et al. *Current and future molecular diagnostics in colorectal cancer and colorectal adenoma.* **World J Gastroenterol.** 2014;20(14):3847-57.
158. Watanabe T, Wu TT, Catalano PJ, Ueki T, Satriano R, Haller DG, et al. *Molecular predictors of survival after adjuvant chemotherapy for colon cancer.* **N Engl J Med.** 2001;344(16):1196-206.
159. Lins TC, Vieira RG, Abreu BS, Grattapaglia D, Pereira RW. *Genetic composition of Brazilian population samples based on a set of twenty-eight ancestry informative SNPs.* **Am J Hum Biol.** 2010;22(2):187-92.
160. Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmao L, Carvalho EF. *Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers.* **Ann Hum Biol.** 2013;40(1):94-8.
161. Manta FSN, Pereira R, Vianna R, Rodolfo Beuttenmuller de Araujo A, Leite Goes Gitai D, Aparecida da Silva D, et al. *Revisiting the genetic ancestry of Brazilians using autosomal AIM-Indels.* **PLoS One.** 2013;8(9):e75145.
162. Center MM, Jemal A, Smith RA, Ward E. *Worldwide variations in colorectal cancer.* **CA Cancer J Clin.** 2009;59(6):366-78.
163. Ehemann C, Henley SJ, Ballard-Barbash R, Jacobs EJ, Schymura MJ, Noone AM, et al. *Annual Report to the Nation on the status of cancer, 1975-2008, featuring cancers associated with excess weight and lack of sufficient physical activity.* **Cancer.** 2012;118(9):2338-66.

164. Jovov B, Araujo-Perez F, Sigel CS, Stratford JK, McCoy AN, Yeh JJ, et al. *Differential gene expression between African American and European American colorectal cancer patients.* **PLoS One.** 2012;7(1):e30168.
165. Hernandez-Suarez G, Sanabria MC, Serrano M, Herran OF, Perez J, Plata JL, et al. *Genetic ancestry is associated with colorectal adenomas and adenocarcinomas in Latino populations.* **Eur J Hum Genet.** 2014;22(10):1208-16.
166. Wanebo HJ, LeGolván M, Paty PB, Saha S, Zuber M, D'Angelica MI, et al. *Meeting the biologic challenge of colorectal metastases.* **Clin Exp Metastasis.** 2012;29(7):821-39.
167. Chua TC, Saxena A, Liauw W, Kokandi A, Morris DL. *Systematic review of randomized and nonrandomized trials of the clinical response and outcomes of neoadjuvant systemic chemotherapy for resectable colorectal liver metastases.* **Ann Surg Oncol.** 2010;17(2):492-501.
168. Society AC. *Colorectal Cancer Facts & Figures 2014-2016.* **Atlanta: American Cancer Society;** 2014.
169. Guastadisegni C, Colafranceschi M, Ottini L, Dogliotti E. *Microsatellite instability as a marker of prognosis and response to therapy: a meta-analysis of colorectal cancer survival data.* **Eur J Cancer.** 2010;46(15):2788-98.
170. Popat S, Hubner R, Houlston RS. *Systematic review of microsatellite instability and colorectal cancer prognosis.* **J Clin Oncol.** 2005;23(3):609-18.
171. Gavin PG, Colangelo LH, Fumagalli D, Tanaka N, Remillard MY, Yothers G, et al. *Mutation profiling and microsatellite instability in stage II and III colon cancer: an assessment of their prognostic and oxaliplatin predictive value.* **Clin Cancer Res.** 2012;18(23):6531-41.
172. Webber EM, Kauffman TL, O'Connor E, Goddard KA. *Systematic review of the predictive effect of MSI status in colorectal cancer patients undergoing 5FU-based chemotherapy.* **BMC Cancer.** 2015;15:156.
173. Sturgeon CM, Duffy MJ, Stenman UH, Lilja H, Brunner N, Chan DW, et al. *National Academy of Clinical Biochemistry laboratory medicine practice guidelines for use of tumor markers in testicular, prostate, colorectal, breast, and ovarian cancers.* **Clin Chem.** 2008;54(12):e11-79.
174. Duffy MJ, van Dalen A, Haglund C, Hansson L, Holinski-Feder E, Klapdor R, et al. *Tumour markers in colorectal cancer: European Group on Tumour Markers (EGTM) guidelines for clinical use.* **Eur J Cancer.** 2007;43(9):1348-60.
175. Locker GY, Hamilton S, Harris J, Jessup JM, Kemeny N, Macdonald JS, et al. *ASCO 2006 update of recommendations for the use of tumor markers in gastrointestinal cancer.* **J Clin Oncol.** 2006;24(33):5313-27.

176. Network NCC. *NCCN clinical practice guidelines in oncology: colon cancer (version 1.2013)*. [Internet] 2013;Available from: <http://www.nccn.org>.

ANEXOS

Anexo A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos

PROJETO DE PESQUISA

Título: Impacto molecular e clínico da instabilidade de microssatélites em pacientes com carcinoma colorretal esporádico do Hospital de Câncer de Barretos.

Área Temática:

Pesquisador: Rui Manuel Vieira Reis

Versão: 3

Instituição: Fundação Pio XII

CAAE: 02468812.3.0000.5437

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 55643

Data da Relatoria: 12/07/2012

Apresentação do Projeto:

Adequada

Objetivo da Pesquisa:

Já discutido e aprovado

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

N/A (estudo retrospectivo)

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As pendências foram respondidas adequadamente.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já discutido e aprovado

Recomendações:

Aprovar o projeto após respostas referentes às pendências

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Pendências justificadas e respondidas adequadamente.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII e Hospital do Câncer de Barretos analisou as pendências do referido projeto e decidindo que o mesmo encontra-se *“Aprovado”*. Solicitamos que sejam encaminhados ao CEP relatórios semestral e final, eventuais emendas ao protocolo, modificações no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e notificações de eventos adversos graves ocorridos a fim de se fazer o devido acompanhamento.

BARRETOS, 13 de Julho de 2012

Assinado por:
Ednise Woyciechowski

Anexo B – Artigo publicado em 2014 na revista *European Journal of Human Genetics*. Fator de impacto em 2015: 4,580.

European Journal of Human Genetics (2014) 22, 875–880
© 2014 Macmillan Publishers Limited All rights reserved 1018-4813/14
www.nature.com/ejhg



ARTICLE

Optimization of a pentaplex panel for MSI analysis without control DNA in a Brazilian population: correlation with ancestry markers

Nathália C Campanella^{1,5}, Gustavo N Berardinelli^{1,5}, Cristovam Scapulatempo-Neto¹, Danilo Viana², Edenir I Palmero¹, Rui Pereira³ and Rui M Reis^{1,4,*}

Microsatellite instability (MSI) testing has been advocated for all newly diagnosed colorectal cancer patients. One of the most common tests is composed by a pentaplex panel of mononucleotides markers (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, and BAT-26), which allows the analysis of MSI in tumors without the need of reference DNA. For that, it is fundamental to establish a quasi-monomorphic variation range (QMVR) for each marker. Herein, we aimed to establish the QMVR in a Brazilian healthy population, to evaluate the feasibility of MSI determination of tumors, without the matching normal DNA. Furthermore, we intend to assess their ancestry using specific ancestry-informative markers (AIMs) and correlate with QMVR. The QMVR was assessed in 214 individuals, through a pentaplex PCR followed by fragment analysis. The ancestry analysis was done by 46 AIMs in a single multiplex PCR followed by capillary electrophoresis. Following QMVR establishment, we observed 23 individuals with alleles outside the QMVR. Importantly, none of them exhibited more than one marker outside the range. Therefore, individuals with instability at ≥ 2 markers would be accurately classified as MSI. The European ancestry proportion was the most frequent (67.5%), followed by the African (19.6%). The comparison of the individuals with alleles within ($n = 191$) and outside ($n = 23$) the QMVR showed statistical difference in the proportions of European and African alleles, confirming the higher polymorphic nature of African ancestry. In conclusion, the present study reports an accurate methodology to assess MSI status without matched-normal DNA and independently of the ethnicity, even in the highly admixed population of Brazil.

European Journal of Human Genetics (2014) 22, 875–880; doi:10.1038/ejhg.2013.256; published online 6 November 2013

Keywords: microsatellite instability; quasi-monomorphic variation range; ancestry

INTRODUCTION

The microsatellite instability (MSI) arises in short repetitive DNA sequences (or microsatellites) due to defects and loss of function of the MMR family genes (*MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1*, and *PMS2*), a system that recognizes and repairs errors that occur during DNA replication, as well as some forms of DNA damage.¹ The MSI is a change in length due to either insertion or deletion of repeating units of microsatellite in tumor DNA that is not seen in the corresponding normal DNA.^{2,3}

The MSI phenotype was first described and constitutes a hallmark of tumors associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) or Lynch's syndrome that is a hereditary cancer predisposition syndrome caused by inactivating germline mutations in the MMR gene family.^{2,4–8} These patients develop tumors at early ages and frequently have multiple tumors in colon and rectum, and less frequently have endometrial, ovarian, and stomach cancers.^{5–7,9} In sporadic colorectal cancer (CRC), the MSI is also observed, but at a lower rate in ~ 10 – 15% .^{2,3,10} Tumors with the MSI phenotype appear to be associated with particular molecular, histopathological, and

clinical features, including mutation profile, specific location, tumors poorly differentiated, high tumor lymphocyte infiltration, low frequency of distant metastasis, and good prognosis.^{11–13}

At a molecular level, studies have showed that oncogenic alterations found in MSI tumors are somatic mutational events that affect coding repeated sequences in numerous target genes.^{13–15} Several MSI-target genes have been identified in MSI-positive tumors, which are involved in important diverse cellular functions and pathways such as DNA repair (eg, *MRE11*, *MSH6*, *BRCA1*, and *BRCA2*), cell growth (eg, *TGF β R2* and *EGFR*), and apoptosis (eg, *IGFR* and *BAX*).^{14,16,17} In sporadic tumors, the MSI is strongly associated with the presence of *BRAF* oncogene mutations,¹⁸ a lack of *KRAS* mutation, and the inactivation of *PTEN* tumor suppressor gene.^{19,20} Thus, the mutation profile in MSI tumors is fundamentally different from other CRCs.¹⁴

From a histopathological and clinical point of view, CRCs with MSI have distinct features, such as location in the proximal colon and the major prevalence in stage II ($\sim 20\%$) compared with stage III ($\sim 12\%$). In stage IV or metastatic CRC, the MSI is relatively uncommon ($\sim 4\%$).^{13,21,22} It is well accepted that CRC patients

¹Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, São Paulo, Brazil; ²Oncogenetic Department, Barretos Cancer Hospital, São Paulo, Brazil; ³PATIMUP – Institute of Molecular Pathology and Immunology of the University of Porto, Porto, Portugal; ⁴Life and Health Sciences Research Institute, University of Minho, and ICVS/3B's-PT Government Associate Laboratory, Braga/Guimarães, Portugal

⁵These authors contributed equally to this work.

*Correspondence: Dr RM Reis, Molecular Oncology Research Center, Barretos Cancer Hospital, Rua Antenor Duarte Vilela, 1331, CEP 14784 400, Barretos, São Paulo, Brazil. Tel: +55 17 3321 6600; E-mail: ruireis.hcb@gmail.com

Received 17 June 2013; revised 19 September 2013; accepted 27 September 2013; published online 6 November 2013



with MSI have an overall better survival than MSS patients.^{23–25} Importantly, MSI is being considered as a predictive biomarker of 5-fluorouracil (5-FU), irinotecan, and other chemotherapeutic agents response.¹⁴ Following an initial study of Elsaleh *et al*²³ where MSI tumors were associated with better response to a 5-FU regimen, many others report tried to validate these findings; however, its predictive value remains controversial. Large retrospective studies confirmed that the effect of 5-FU is restricted to stage II MSI-positive cases²⁴ and is not applicable to stage III MSI-positive ones.²⁵ Yet, a recent meta-analysis interrogated this issue and did not confirm the predictive value of MSI for 5-FU therapy at any stage.²⁶ Interestingly, a recent study of Dorard *et al*¹⁵ identified the *HSP110* as a novel MSI-target gene in colorectal tumors. The authors reported that the overexpression of the mutant *HSP110* caused the sensitization of cells to oxaliplatin and 5-FU, and raised the hypothesis that the MSI-target genes rather than the MSI phenotype can be predictive of chemotherapy regimens.¹⁵

Due to the need of a better understanding of the clinical and histologic manifestations of HNPCC, the National Cancer Institute (NCI) hosted in 1997 an international workshop on HNPCC, which culminated with the development of a panel of genetic markers that allows the identification of MSI-positive individuals at-risk for HNPCC. This panel is known as Bethesda panel²⁷ and includes five markers: two mononucleotide (BAT-25 and BAT-26) and three dinucleotide (D5S346, D2S123, and D17S250) repeats. Tumors with instability at two or more of these markers were defined as MSI-high (MSI-H), whereas those with instability in one repeat or showing no instability were defined as MSI-low (MSI-L) and microsatellite stable (MSS), respectively.²⁸ Following this landmark panel, several others were reported using tetra, di, and mononucleotide repeats, for MSI screening/diagnosis. However, all of these assays required standardization and the need to include matched-normal DNA as a reference.^{2,8,28}

Posteriorly, in 2002 another HNPCC workshop was held at NCI for re-evaluation and improvement of the Bethesda Guidelines.^{27,28} This workshop concluded the existence of limitations on the application of the above-mentioned markers, and it was recommended that the dinucleotide repeats should be substituted by mononucleotide repeats.²⁸ Consequently, an optimized assay of five mononucleotide markers (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, and NR-27) was established for MSI screening avoiding the use of paired normal DNA.^{8,29} Thereafter, this panel of markers has been used by some authors in a pentaplex PCR assay to evaluate MSI status without the need of matched-reference DNA.^{8,28–31} Using this panel, the criterion used to classify a tumor as MSI is not consensual. Several authors suggest that the minimum number of unstable markers required are 2 out of 5,^{29,32} whereas other studies suggest 3 out of 5 markers to determine an MSI-H phenotype.^{27,28}

These five mononucleotide markers show a quasi-monomorphic variation in accordance with different ethnicities: Sub-Saharan Africans showed variant alleles above or approaching 10% for NR-27, BAT-25, and BAT-26, and the other populations (European, East Asian, and Native American) did not reach a frequency of 10% variant alleles for any of the markers.²⁸ In Europe, >95% of individuals do not show any variant alleles in the five markers, whereas in the remaining 5%, individuals present variant alleles in only one marker.²⁸ In the current admixed Brazilian population, these markers were not evaluated and the quasi-monomorphic variation range (QMVR) is still undetermined.

One accurate estimative of ancestry proportions at the population level is possible by making use of ancestry-informative markers (AIMs).^{33–36} Some of these studies are focused on insertion

deletion polymorphisms (INDELs) that are likely to be important factors underlying inherited traits in humans.³³ Recently, using a set of AIM-INDELs, we estimated the ancestry proportions of individuals from Amazonas, Belém, and Rio de Janeiro populations in Brazil.^{33,37} We concluded that this panel has accuracy and is suitable to estimate genetic ancestry in highly admixed populations such as the Brazilian.^{33,37}

Herein, we aimed to establish the QMVR of BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, and NR-27 markers, in a Brazilian healthy population, to evaluate the feasibility of MSI status determination of tumors without the need of matching normal DNA. Furthermore, we intend to determine the ancestry of Brazilian individuals using specific AIM-INDELs and correlate with their QMVR.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Blood normal DNA was obtained from 214 healthy individuals provided by the BioBank of the Barretos Cancer Hospital, Barretos, São Paulo, Brazil. This study was approved by the local ethic commit (600/2012). The average age of the individuals was 33 years old, 52.3% were male, and 90% of the individuals came from southeast region of Brazil (São Paulo and Minas Gerais states), whereas others came from Paraná, Rio Grande do Sul, Bahia, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Pernambuco, and Rondônia regions. Blood DNA was extracted using the QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's instructions. In addition, cancer cell lines were used as controls. The CRC cell lines Co115, DLD1, and LoVo were used as an MSI-positive control, and CaCo2, DIFI, HT29, SW480, and SW620 were used as an MSI-negative control. The DNA from cancer cell lines was extracted using Trizol reagent (Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA) following the manufacturer's protocol.

MSI analysis

The MSI evaluation was performed using a multiplex PCR comprising five quasi-monomorphic mononucleotide repeat markers (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24, and NR-27).^{28,38} Primer sequences were described elsewhere.²⁸ Each antisense primer was end labeled with a fluorescent dye: FAM (6-carboxyfluorescein) for BAT-26 and NR-21; VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein) for BAT-25 and NR-27; and NED (2,7,8-benzo-5-fluoro-2,4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein) for NR-24. PCR was performed using the Qiagen Multiplex PCR Kit (Qiagen), with 0.5 µl of DNA at 50 ng/µl and the following thermocycling conditions: 15 min at 95 °C; 40 cycles of 95 °C for 30 s, 55 °C for 90 s and 72 °C for 30 s; and a final extension at 72 °C for 60 min. PCR products were then submitted to capillary electrophoresis on an ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) according to the manufacturer's instructions and the results were analyzed using GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems) software.

The QMVR of each marker was established from an average of the alleles' size with a range of plus or minus three nucleotides in accordance with the literature.^{29,30}

Ancestry analysis

The ancestry analysis was performed using a set of 46 AIMs among the most informative INDELs for each population group as previously described.³³ Primer sequences and PCR conditions were according to Pereira *et al*.³³ A 46plex PCR was performed and the amplified products were further submitted to fragment analysis on an ABI 3500 xL Genetic Analyzer (Applied Biosystems), according to the manufacturer's instructions. The electropherograms were analyzed and genotypes were automatically assigned with GeneMapper v4.1 (Applied Biosystems).

Ancestry proportions were then assessed using the Structure v2.3.3 software,^{39,40} considering the four major population groups of Native American, European, African, and East Asian as possible contributors to the current genetic makeup of Brazilians. Using the data available for the HGD-CEPH panel as a reference for the ancestral populations, a supervised analysis was performed to estimate ancestry membership proportions of the individuals

involved in the study. Structure runs considering $K=4$ consisted of 100 000 burnin steps followed by 100 000 Markov Chain Monte Carlo iterations. The option 'Use population Information to test for migrants' was used with the Admixture model, considering allele frequencies correlated, and updating allele frequencies using only individuals with $POPFLAG=1$.

The SPSS 19.0 software (IBM Corp, Armonk, NY, USA) was used for all statistics analysis. The P -value established for the statistics significance was <0.05 .

RESULTS

Determination of QMVR using the 5-marker panel

All the 214 samples were successfully amplified for the five markers, generating 428 alleles for each marker. The allele's sizes and the absolute and relative frequencies for each marker are showed in Table 1 and Figure 1. All raw data are shown in Supplementary Table 1.

NR-27 demonstrated a stable profile with a QMVR of 82–88 bp, with only one allele (81 bp) outside the QMVR. For NR-21, the size of the quasi-monomorphic alleles ranged from 101 to 107 bp, and five alleles of 100 bp were outside the established QMVR. NR-24 showed a QMVR of 119–125 bp and no allele outside the range was found. Both BAT-25 and BAT-26 exhibited a bimodal distribution: the determined QMVR of BAT-25 was 142–148 bp and 6 individuals (1.38%) harbored variant alleles outside it, while BAT-26 had an established QMVR of 174–180 bp and 14 individuals (3.23%) had alleles outside the QMVR range (Table 1; Figure 1).

Overall, we identified a total of 23 individuals that showed alleles outside the QMVR. Importantly, none of them showed more than one marker outside the range (Table 2), and independently of the 2/5 or 3/5 cutoff used for MSI-H definition, none of the healthy individuals would be erroneously classified as MSI. As expected, all colorectal cell lines known to be MSI (HCT15, DLD1, and LoVo) exhibited a MSI-H profile, and the known MSS cell lines (CaCo2, DIFI, HT-29, SW480, and SW620), were correctly classified (Supplementary Table 2).

Ancestry analysis

The results obtained for the complete AIM-INDEL panel allowed us to estimate the AFR, EUR, EAS, and NAM ancestral proportions of the 214 healthy individuals (all raw data are shown in Supplementary

Table 1). The average ancestry proportions for all individuals were 67.5% for EUR, 19.6% for AFR, 6.7% for NAM, and 6.2% for EAS (Table 3; Figure 2).

We further compared the ancestry estimates of individuals exhibiting alleles outside and within the QMVR. We observed that the 23 individuals with alleles outside the QMVR showed mean ancestry proportions of 49.6% for EUR, 37.2% for AFR, 7.6% of EAS, and 5.6% of NAM, whereas the 191 individuals within the QMVR showed 69.7% for EUR, 17.5% of AFR, 6.8% of NAM, and 6% of EAS (Table 4). These differences were statistically significant for the AFR ($P<0.001$) and EUR ($P=0.001$) ancestral contributions (Table 4). In fact, when we consider individuals with essentially European ancestry (EUR membership proportion $>90\%$) only one allele outside the QMVR was observed.

DISCUSSION

The determination of MSI status is of extreme importance for at-risk identification of HNPCC individuals and molecular characterization

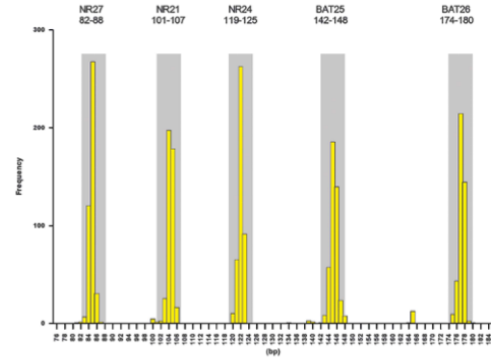


Figure 1 Frequency of allele size distribution (in base pairs) for the five markers from 214 normal DNA specimens. For each marker, the gray shading indicates the QMVR established.

Table 1 Sizes of the alleles and the QMVR for each marker

NR-27			NR-21			NR-24			BAT-25			BAT-26		
Size (bp)	N	%	Size (bp)	N	%	Size (bp)	N	%	Size (bp)	N	%	Size (bp)	N	%
80			99			118			133			163		
81	1	0.23	100	4	0.93	119			134	1	0.23	164	1	0.23
82	2	0.46	101	2	0.46	120	11	2.57	135			165	13	3
83	7	1.63	102	3	0.7	121	65	15.18	139	3	0.69	174		
84	119	27.8	103	26	6.07	122	263	61.4	140	2	0.46	175	11	2.57
85	265	61.9	104	195	45.56	123	89	20.79	142	1	0.23	176	45	10.51
86	32	7.48	105	182	42.52	124			143	9	2.1	177	212	49.63
87	2	0.46	106	16	3.73	125			144	55	12.85	178	142	33.17
88			107			126			145	185	43.22	179	3	0.7
89			108						146	140	32.7	180	1	0.23
									147	24	5.6	181		
									148	8	1.87	182		
									149					
									150					

The dark-gray shading represents the mean and the light-gray shading shows the established QMVR for each marker.

**Table 2** Detail of all markers of the individuals with alleles outside the QMVR

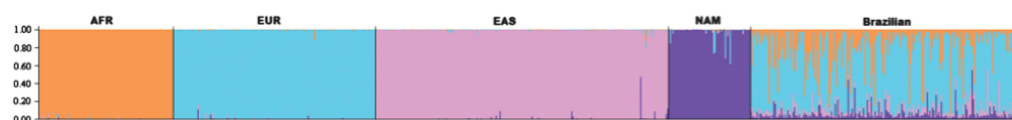
ID	Age	Gender	NR-27		NR-21		NR-24		BAT-25		BAT-26	
			82–88		101–107		119–125		142–148		174–180	
C1	23	F	85	85	100	105	122	122	145	146	177	178
C15	23	M	84	85	104	105	122	123	145	146	165	177
C3	29	M	85	85	104	105	122	123	134	146	177	178
2	18	M	85	85	103	105	120	120	139	146	177	178
13	18	F	84	85	100	104	122	123	145	146	175	176
16	31	M	84	84	104	105	121	122	144	146	165	177
22	41	M	85	85	104	104	122	123	145	145	165	176
34	18	M	85	85	105	105	120	120	139	140	177	179
36	31	F	81	85	104	105	122	122	145	146	177	178
45	41	F	85	85	105	105	122	122	145	146	165	176
49	18	M	84	85	104	105	122	123	139	146	177	178
53	31	M	84	85	103	105	122	122	144	144	165	177
56	41	M	84	85	104	105	122	122	145	146	165	176
63	51	M	85	85	104	104	121	122	144	146	165	177
75	18	M	84	85	100	105	122	122	146	146	176	177
91	41	F	85	85	100	105	122	122	144	145	177	178
97	41	M	84	85	104	105	121	122	145	145	165	177
108	51	F	82	86	105	105	121	122	145	146	165	178
125	51	M	86	86	104	104	122	122	145	146	165	177
135	18	F	85	85	102	103	122	122	144	145	165	177
136	51	M	85	85	102	103	122	122	144	145	165	177
151	18	M	85	85	105	105	121	121	145	146	165	178
162	41	M	85	86	104	105	122	122	144	145	164	177

Abbreviations: F, Female; M, Male; light gray, alleles outside the QMVR.

Table 3 Ancestral membership proportions (average) for the HGDP-CEPH Diversity Panel reference samples and the studied Brazilian population

	AFR	EUR	EAS	NAM
HGDP-CEPH AFR origin	99.5%	0.2%	0.2%	0.1%
HGDP-CEPH EUR origin	0.2%	99.3%	0.2%	0.3%
HGDP-CEPH EAS origin	0.1%	0.3%	99.0%	0.6%
HGDP-CEPH NAM origin	0.1%	2.3%	0.4%	97.2%
Present Brazilian population (SD)	19.6% (21.9)	67.6% (23.9)	6.1% (6.2)	6.7% (7.3)

Abbreviations: AFR, African; EUR, European; EAS, East Asian; NAM, Native American; SD, standard deviation.

**Figure 2** Individual ancestry estimates for the testing Brazilian population using the HGDP-CEPH diversity panel genetic data as a training set.

of sporadic CRC.^{2,7} In fact, the Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group recommends MSI testing to all newly diagnosed CRC patients.⁴¹ Of the several panel of genetic markers available, the use of pentaplex quasi-monomorphic markers (NR-27, NR-21, NR-24, BAT-25, and BAT-26) is one of the most disseminated worldwide, and are the base of the Promega MSI kit (Promega, Madison, WI, USA).^{2,7,30} The optimization of QMVR for each quasi-monomorphic marker is necessary because the allelic size estimation can be influenced by several factors, such as the use of specific reagents and sensibility of

the sequencer apparatus utilized, as well as population ethnicity. In the current admixed Brazilian population, the variation of the pentaplex quasi-monomorphic markers was not evaluated and the QMVR was undetermined. In the present study, we analyzed the allelic size variation of the five mononucleotide markers in a series of germline DNA from 214 healthy Brazilian individuals, determined their QMVR and correlated with individuals ancestry determined by AIMS.

The QMVRs established from each marker were 82–88 bp for NR-27, 101–107 for NR-21, 119–125 for NR-24, 142–148 for BAT-25,

Table 4 Ancestral membership proportions (average) considering the subsets of individuals within and outside the QMVR

	Individuals with alleles within QMVR	Individuals with alleles outside QMVR	P-value (Mann–Whitney test)
AFR (SD)	17.5% (20.1)	37.2% (27.7)	<0.001
EUR (SD)	69.7% (22.4)	49.6% (28.6)	0.001
EAS (SD)	6% (6.2)	7.6% (6.5)	0.277
NAM (SD)	6.8% (7.6)	5.6% (5.2)	0.786

Abbreviations: AFR, African; EUR, European; EAS, East Asian; NAM, Native American; SD, standard deviation.

and 174–180 for BAT-26. The frequency of variant alleles for each marker was variable: BAT-26 marker showed the major proportion of variant alleles, with 14 alleles outside the QMVR. BAT-25 presented six alleles outside the QMVR, followed by NR-21 with four alleles and NR-27 with one allele. For NR-24, no alleles were observed out of the determined QMVR. The QMVR for all markers in our individuals differed by few base pairs in relation to what had been reported previously.^{28,29} When considering the five markers, the analyses showed 191 individuals (89.25%) within the QMVR, and 23 individuals (10.75%) exhibited one allele outside the QMVR. Buhard *et al*²⁸ had established a QMVR analyzing 1206 individuals from 55 different worldwide populations including the HGDP-CEPH panel and found that 87.5% of cases showed alleles within the QMVR,²⁸ a similar result as observed in our study. Importantly, the authors assessed 45 individuals from 2 native Brazilian populations (Karitiana and Surui) and none of them exhibited a marker outside the QMVR.²⁸ Therefore, analyzing the current Brazilian population, which results from the miscegenation of distinct ethnic groups, our study is of grant relevance for MSI determination for clinical application.

To correlate markers allele size with individual's ancestry, we performed the analysis of an AIM-INDEL panel that could discriminate a four-group contribution. This four-group analysis is due to the historical migration of populations, where the Native Americans suffered admixture with Europeans, followed by African, and more recently with a significant East Asian community, mainly in São Paulo state.

Using this AIM-INDEL panel, we showed that the average ancestry proportions of the 214 individuals were 67.5% of European, 19.6% of African, 6.7% of Native Americans, and 6.2% of East Asian. Using the same panel, Pereira *et al*³³ analyzed a Brazilian population from Belém (northeastern region of Brazil), and identified distinct frequency of ancestry: 53.5% EUR; 14.8% AFR; 22.9% NAM, and 8.8% EAS,³³ most probably representing the higher native American ancestry of the region.

Furthermore, Manta *et al*³⁷ analyzed a Brazilian population from Rio de Janeiro, and using the same AIMs panel observed 55.2% of EUR, 31.1% of AFR, and 13.7% of NAM. Using a different panel of the markers, Pena *et al*⁴² performed a wider ancestry analysis of Brazilian population from distinct geographical regions (North, Northeast, Southeast, and South). The authors described for the southeast region similar frequencies to the ones obtained in our studied population, namely 74.2% of European, 17.3% of African, and 7.3% of Amerindian ancestry.⁴² The majority of the alleles found in our population outside the QMVR are on the BAT-25 and BAT-26 markers. These loci are described as rather polymorphic in African populations.³⁰ In consonance, we showed that the Brazilian individuals harboring those variants showed a higher African

ancestry. Nevertheless, we observed that none of the individuals with polymorphism exhibited more than one marker outside the established QMVR.

An important issue with the use of the present pentaplex panel for MSI testing without the need of reference DNA is the minimum number of unstable markers needed to categorize a tumor as MSI. The literature is ambiguous, varying from 2 to 3 out of 5 markers. In the present study of an admixed population from the Southeast of Brazil, none of the individuals showed more than one unstable marker. Therefore, we suggest classifying as MSI-H, individuals with instability at two or more markers. Since the presence of instability in one marker can be due to polymorphic variants, we proposed that these subjects should be further analyzed by MMR immunohistochemistry, or a PCR using paired normal DNA, for accurately determine the MSI-L status of patients. Therefore, our results demonstrated that this methodology allows characterizing the MSI status without the need of the matched blood for each patient. This constitute a very important advantage since molecular diagnostic laboratories often received only the formalin-fixed paraffin-embedded tumor tissue, not having access to matched blood of the patient.

In conclusion, this is the first study that reports the optimization and establishment of a suitable QMVR for a pentaplex system of MSI markers and characterizes their genetic variation in the Brazilian population for molecular diagnosis purposes. We found a noticeable number of alleles outside the QMVR, which appear directly associated with an important African ancestral component present in the current Brazilian population, as depicted by the use of AIMs. Despite the higher frequency of variant alleles in individuals with African ancestry, no individuals showed more than one allele outside the established QMVR in our study, and therefore our results corroborate that this methodology may be used with confidence to assess MSI status without matched-normal DNA and independently of the ethnicity, even in the highly admixed population of Brazil.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

The present study was partially supported by a MCT/FINEP/CT-INFRA-PROINFRA 02/2010 grant and a CNPq Universal grant (475358/2011-2). Nathália Cristina Campanella is a recipient of an FAPESP Master Grant (2012/01732-2). IPATIMUP is an Associate Laboratory of the Portuguese Ministry of Science, Technology and Higher Education and is partially supported by the Portuguese Foundation for Science and Technology (FCT). Rui Pereira is a recipient of a postdoctoral fellowship from FCT (SFRH/BPD/81986/2011).

- Karran P: Microsatellite instability and DNA mismatch repair in human cancer. *Semin Cancer Biol* 1996; **7**: 15–24.
- Vilar E, Gruber SB: Microsatellite instability in colorectal cancer—the stable evidence. *Nat Rev Clin Oncol* 2010; **7**: 153–162.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR *et al*: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998; **58**: 5248–5257.
- Viana-Pereira M, Lee A, Popov S *et al*: Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. *PLoS One* 2011; **6**: e20588.
- Boland CR, Goel A: Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 2010; **138**: 2073–2087, e2073.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D: Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; **260**: 816–819.
- Vilkkii S, Launonen V, Karhu A, Sistonen P, Vastrik I, Aaltonen LA: Screening for microsatellite instability target genes in colorectal cancers. *J Med Genet* 2002; **39**: 785–789.



- 8 Suraweera N, Duval A, Reperant M et al: Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology* 2002; **123**: 1804–1811.
- 9 Fearon ER: Molecular genetics of colorectal cancer. *Annu Rev Pathol* 2011; **6**: 479–507.
- 10 Calin GA, Gafa R, Tibiletti MG et al: Genetic progression in microsatellite instability high (MSI-H) colon cancers correlates with clinico-pathological parameters: a study of the TGRbetaRII, BAX, hMSH3, hMSH6, IGF1R and BLM genes. *Int J Cancer* 2000; **89**: 230–235.
- 11 Jass JR, Do KA, Simms LA et al: Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* 1998; **42**: 673–679.
- 12 Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ et al: Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* 2003; **349**: 247–257.
- 13 Sinicrope FA, Sargent DJ: Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 1506–1512.
- 14 Vilar E, Tabernero J: Molecular dissection of microsatellite unstable colorectal cancer. *Cancer Discov* 2013; **3**: 502–511.
- 15 Dorard C, de Thonel A, Collura A et al: Expression of a mutant HSP110 sensitizes colorectal cancer cells to chemotherapy and improves disease prognosis. *Nat Med* 2011; **17**: 1283–1289.
- 16 Alhopuro P, Sammalampi H, Niittymäki I et al: Candidate driver genes in microsatellite-unstable colorectal cancer. *Int J Cancer* 2012; **130**: 1558–1566.
- 17 Mori Y, Yin J, Rashid A et al: Instability typing: comprehensive identification of frameshift mutations caused by coding region microsatellite instability. *Cancer Res* 2001; **61**: 6046–6049.
- 18 Oliveira C, Pinto M, Duval A et al: BRAF mutations characterize colon but not gastric cancer with mismatch repair deficiency. *Oncogene* 2003; **22**: 9192–9196.
- 19 Parsons DW, Wang TL, Samuels Y et al: Colorectal cancer: mutations in a signalling pathway. *Nature* 2005; **436**: 792.
- 20 Goel A, Arnold CN, Niedzwiecki D et al: Frequent inactivation of PTEN by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Res* 2004; **64**: 3014–3021.
- 21 Koopman M, Kortman GA, Mekenkamp L et al: Deficient mismatch repair system in patients with sporadic advanced colorectal cancer. *Br J Cancer* 2009; **100**: 266–273.
- 22 Roth AD, Tejpar S, Delorenzi M et al: Prognostic role of KRAS and BRAF in stage II and III resected colon cancer: results of the translational study on the PETACC-3, EORTC 40993, SAKK 60-00 trial. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 466–474.
- 23 Elsaleh H, Joseph D, Griew F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B: Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; **355**: 1745–1750.
- 24 Sargent DJ, Marsoni S, Monges G et al: Defective mismatch repair as a predictive marker for lack of efficacy of fluorouracil-based adjuvant therapy in colon cancer. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 3219–3226.
- 25 Sinicrope FA, Foster NR, Thibodeau SN et al: DNA mismatch repair status and colon cancer recurrence and survival in clinical trials of 5-fluorouracil-based adjuvant therapy. *J Natl Cancer Inst* 2011; **103**: 863–875.
- 26 Des Guetz G, Schischmanoff O, Nicolas P, Perret GY, Moreire JF, Uzzan B: Does microsatellite instability predict the efficacy of adjuvant chemotherapy in colorectal cancer? A systematic review with meta-analysis. *Eur J Cancer* 2009; **45**: 1890–1896.
- 27 Umar A, Boland CR, Terdiman JP et al: Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 261–268.
- 28 Buhard O, Cattaneo F, Wong YF et al: Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol* 2006; **24**: 241–251.
- 29 Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR: An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE* 2010; **5**: e9393.
- 30 Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X: A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. *Diagn Mol Pathol* 2012; **21**: 127–133.
- 31 Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S et al: Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol* 2009; **11**: 458–467.
- 32 Xicola RM, Llor X, Pons E et al: Performance of different microsatellite marker panels for detection of mismatch repair-deficient colorectal tumors. *J Natl Cancer Inst* 2007; **99**: 244–252.
- 33 Pereira R, Phillips C, Pinto N et al: Straightforward inference of ancestry and admixture proportions through ancestry-informative insertion deletion multiplexing. *PLoS One* 2012; **7**: e29684.
- 34 Parra EJ, Marcini A, Akey J et al: Estimating African American admixture proportions by use of population-specific alleles. *Am J Hum Genet* 1998; **63**: 1839–1851.
- 35 Kosoy R, Nassir R, Tian C et al: Ancestry informative marker sets for determining continental origin and admixture proportions in common populations in America. *Hum Mutat* 2009; **30**: 69–78.
- 36 Tian C, Gregersen PK, Seldin MF: Accounting for ancestry: population substructure and genome-wide association studies. *Hum Mol Genet* 2008; **17**: R143–R150.
- 37 Manta FS, Pereira R, Caiafa A, Silva DA, Gusmão L, Carvalho EF: Analysis of genetic ancestry in the admixed Brazilian population from Rio de Janeiro using 46 autosomal ancestry-informative indel markers. *Ann Hum Biol* 2013; **40**: 94–98.
- 38 Buhard O, Suraweera N, Llectard A, Duval A, Hamelin R: Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers* 2004; **20**: 251–257.
- 39 Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P: Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 2000; **155**: 945–959.
- 40 Falush D, Stephens M, Pritchard JK: Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* 2003; **164**: 1567–1587.
- 41 Berg AO, Armstrong K, Botkin J et al: Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med* 2009; **11**: 35–41.
- 42 Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M et al: The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PLoS One* 2011; **6**: e17063.

Supplementary Information accompanies this paper on European Journal of Human Genetics website (<http://www.nature.com/ejhg>)

Anexo C – Ficha estruturada para coleta de dados clínico-patológicos.

Nome ou etiqueta

Data da extração:

Pesquisador:

DADOS DEMOGRÁFICOS			
1	Identificação	1	
2	Iniciais do Nome do Paciente	2	
3	Registro Hospitalar	3	
4	Sexo 0- Masculino; 1- Feminino	4	
5	Data de Nascimento DD/MM/AAAA	5	
DIAGNÓSTICO			
6	Data do diagnóstico DD/MM/AAAA	6	
7	Localização do tumor primário 1- ceco/apêndice cecal; 2- cólon ascendente; 3- cólon transversal; 4- cólon descendente; 5- cólon sigmoide; 6- reto baixo; 7- outros ; 99- Ignorado	7	
7a	Se reto, detalhar: 1- Baixo; 2- Médio; 3- Alto; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	7a	
8	Estágio ao diagnóstico (AJCC 2010) cólon/reto alto 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- IIC; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- III clínico (para tumores de reto baixo/médio); 9- IVA; 10- IVB; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	8	
8a	Estágio ao diagnóstico (AJCC 2010) reto médio/reto baixo 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- IIC; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- III clínico (para tumores de reto baixo/médio); 9- IVA; 10- IVB; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	8a	
9	Tumor Primário: 0- Tis/0; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4a; 5- T4b; 88- Não se aplica ; 99- Ignorado	9	
10	Linfonodos Regionais 0- N0; 1- N1a; 2- N1b; 3- N1c; 4- N2a; 5- N2b; 6- LNF + (tumores de reto médio/baixo); 88- Não se aplica; 99- Ignorado	10	
11	Metástases 0- M0; 1- M1a; 2- M1b; 99- Ignorado	11	
12	Tipo histológico 0- Adenocarcinoma; 1- Misto; 2- Outro: _____; 99- Ignorado	12	
13	Grau Histológico 1- Grau I; 2- Grau II; 3- Grau III; 99- Ignorado	13	
14	Invasão Angiolinfática 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	14	
15	Invasão Perineural 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	15	

DIAGNÓSTICO - TUMOR SINCRÔNICO			
6b	Tumor sincrónico? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	6b	
7b	Localização do tumor primário 1- ceco/apêndice cecal; 2- cólon ascendente; 3- cólon transverso; 4- cólon descendente; 5- cólon sigmoide; 6- reto baixo; 7- outros ; 99 - Ignorado	7b	
7ab	Se reto, detalhar: (sincrónico) 1- Baixo; 2- Médio; 3- Alto; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	7ab	
8b	Estágio ao diagnóstico (AJCC 2010) cólon/reto alto 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- IIC; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- III clínico (para tumores de reto baixo/médio); 9- IVA; 10- IVB; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	8b	
8ab	Estágio ao diagnóstico (AJCC 2010) reto médio/reto baixo 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- IIC; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- III clínico (para tumores de reto baixo/médio); 9- IVA; 10- IVB; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	8ab	
9b	Tumor Primário cólon/reto alto 0- Tis/0; 1- T1; 2- T2; 3- T3; 4- T4a; 5 -T4b; 88- Não se aplica ; 99- Ignorado	9b	
10b	Linfonodos Regionais 0- N0; 1- N1a; 2- N1b; 3- N1c; 4- N2a; 5- N2b; 6- LNF + (tumores de reto médio/baixo); 88- Não se aplica; 99- Ignorado	10b	
11b	Metástases 0- M0; 1- M1a; 2- M1b; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	11b	
12b	Tipo histológico 0- Adenocarcinoma; 1- Misto; 2- Outro: _____; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	12b	
13b	Grau Histológico 1- Grau I; 2- Grau II; 3- Grau III; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	13b	
14b	Invasão Angiolinfática 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	14b	
15b	Invasão Perineural 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	15b	
TRATAMENTO CIRÚRGICO			
16	Cirurgia do primário 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	16	
17	Data da cirurgia do primário DD/MM/AAAA	17	
18	Cirurgia de urgência? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	18	
19	Número de Linfonodos ressecados 88888- Não se aplica; 99999- Ignorado	19	
20	Número de Linfonodos positivos Número; 888- Não se aplica; 999- Ignorado	20	
21	Grau de Ressecção 0- R0; 1- R1; 2- R2; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	21	

22	Realizou colostomia/ileostomia? 0- Não; 1- Sim, no próprio ato cirúrgico; 2- Sim, previamente; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	22	
23	Realizou tratamento pré-operatório? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	23	
24	Qual tratamento pré-operatório? 0- RT exclusiva; 1- QT exclusiva; 2- RTQT; 3- Outro; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	24	
DADOS DO TRATAMENTO ADJUVANTE E NEOADJUVANTE			
25	Quimioterapia neoadjuvante 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	25	
26	Regime 0- Não; 1- Mayo Clinic; 2- QUASAR; 3- Roswell Park; 4- Fluoropirimidina oral; 5- FOLFOX; 6- XELOX; 7- Outro (FLOX); 88- Não se aplica; 99- Ignorado	26	
27	Data de início da quimioterapia neoadjuvante DD/MM/AAAA	27	
28	Data de término da quimioterapia neoadjuvante DD/MM/AAAA	28	
29	Quimioterapia adjuvante 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	29	
30	Motivo da não realização de quimioterapia adjuvante 0- Estágio 0/I/II de baixo risco; 1- Tempo transcorrido entre o tratamento cirúrgico e a avaliação; 2- Idade; 3- Comorbidades; 4- ECOG ruim; 5- Complicações PO; 6- Mais do que um critério (especifique ao lado); 7- Óbito por complicação PO; 8- Óbito outros; 9- Progressão de doença ou metastática durante estadiamento; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	30	
31	Regime 0- Não; 1- Mayo Clinic; 2- QUASAR; 3- Roswell Park; 4- Fluoropirimidina oral; 5- FOLFOX; 6- XELOX; 7- Outro (FLOX); 88- Não se aplica; 99- Ignorado	31	
32	Data de Início da quimioterapia adjuvante DD/MM/AAAA	32	
33	Data de Término da quimioterapia adjuvante DD/MM/AAAA	33	
34	Completo o tratamento adjuvante? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	34	
35	Motivo de não ter completado o tratamento: 0- EA proibitivo; 1- Comorbidade; 2- Óbito por outras causas; 3- Óbito por EA; 4- Retirada do consentimento; 5- Evidência de recidiva/surgimento de metástases; 6- Em vigência de quimioterapia; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	35	
36	Radioterapia 0- Não; 1- Neoadjuvante; 2- Adjuvante; 3- Paliativo; 99- Ignorado	36	
37	Data de Início da radioterapia DD/MM/AAAA	37	
38	Data de Término da radioterapia DD/MM/AAAA	38	
39	Dose total cGy	39	

40	Quimiorradioterapia concomitante 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	40	
DADOS DO TRATAMENTO PALIATIVO			
41	Houve recorrência? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	41	
42	Data do primeiro diagnóstico de doença recorrente ou metastática DD/MM/AAAA	42	
43	Recorrência Local? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	43	
44	Metástases em Linfonodos não-regionais 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	44	
45	Metástases em Peritônio 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	45	
46	Metástases em Fígado 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	46	
47	Metástases em Pulmão e Pleura 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	47	
48	Metástases em Ossos 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	48	
49	Metástases em SNC 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	49	
50	Metástases em Outros Sítios 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	50	
51	Recebeu 5-FU na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	51	
52	Recebeu capecitabina na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	52	
53	Recebeu oxaliplatina na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	53	
54	Recebeu irinotecano na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	54	
55	Recebeu bevacizumabe na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	55	
56	Recebeu cetuximabe na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	56	
57	Recebeu outra droga na palição? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	57	
SOBREVIVÊNCIA GLOBAL			
58	Status de sobrevivência 0- Vivo sem doença; 1- Vivo com doença; 2- Óbito por câncer; 3- Óbito por outras causas; 99- Ignorado	58	
59	Data do óbito DD/MM/AAAA	59	
60	Data da última informação DD/MM/AAAA	60	

61	Diagnóstico de outra neoplasia primária? 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	61	
62	Data do diagnóstico do segundo tumor primário DD/MM/AAAA	62	
ADENDOS À FICHA			
63	Estágio patológico (AJCC 2010) - preencher apenas se realizou tratamento pré-operatório 0- 0; 1- I; 2- IIA; 3- IIB; 4- IIC; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- IVA; 9- IVB; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	63	
64	Tumor Primário - preencher apenas se realizou tratamento pré-operatório 0- Tis; 1- T0; 2- T1; 3- T2; 4- T3; 5- T4a; 6- T4b ; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	64	
65	Linfonodos Regionais - preencher apenas se realizou tratamento pré-operatório 0- N0; 1- N1a; 2- N1b; 3- N1c; 4- N2a; 5- N2b; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	65	
66	Metástases - preencher apenas se realizou tratamento pré-operatório 0- M0; 1- M1a; 2- M1b; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	66	
67	Tratamento local/radical de M1 0- Não; 1- Sim; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	67	
68	Tipo de tratamento radical de M1 1- Cirurgia; 2- Radioablação; 88- Não se aplica; 99- Ignorado	68	