

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO KRAS MUTANTE, KU70, TACSTD2 E
SERIN1 EM TECIDOS TUMORAL E NORMAL DE PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL**

TIAGO LEAL GHEZZI

ORIENTADOR: PROF. DR. OLY CAMPOS CORLETA

PORTO ALEGRE

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS CIRÚRGICAS

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO KRAS MUTANTE, KU70, TACSTD2 E
SERIN1 EM TECIDOS TUMORAL E NORMAL DE PACIENTES COM CÂNCER
COLORRETAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL**

TIAGO LEAL GHEZZI

Dissertação de mestrado apresentada ao PPG em
Medicina: Ciências Cirúrgicas como pré-requisito
obrigatório para a obtenção do título de Mestre em
Medicina: Ciências Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr. Oly Campos Corleta

PORTO ALEGRE

2010

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

G421c Ghezzi, Tiago Leal

Comparação da expressão gênica do KRAS mutante, KU70, TACSTD2 e SERIN 1em tecidos tumoral e normal de pacientes com câncer colorretal pela técnica de PCR em tempo real / Tiago Leal Ghezzi. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

108 p.: il. tab. Inclui um artigo de periódico.

Orientador: Prof. Dr. Oly Campos Corletta.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina: área de concentração: Ciências Cirúrgicas.

1. NEOPLASIAS COLORRETAIS/epidemiologia. 2. EXPRESSÃO GÊNICA. 3. ESTADIAMENTO DE NEOPLASIAS. 4. PROGNÓSTICO. 5. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 6. INTESTINO GROSSO/patologia. 7. GENES NEOPLÁSICOS. 8. BIOLOGIA MOLECULAR. 9. RNA. 10. DNA. 11. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 12. ESTUDOS TRANSVERSAIS. I. Corletta, Oly Campos. II. Título.

.D.D. 616.99435

DEDICATÓRIA

À Lúcia
por seu amor incondicional e pelo companheirismo incansável.

Aos meus pais Maria Inês e Henrique
pela vida maravilhosa que me proporcionaram e por acreditarem em mim.

Ao meu irmão Leandro
pelo grande parceiro e melhor amigo que és.

Ao meu avô Walter (*in memoriam*),
pelo pioneirismo na coloproctologia gaúcha.

Ao meu orientador Oly Corleta
pelo seu exemplo profissional e por nossa amizade.

AGRADECIMENTOS

A todos que colaboraram na realização deste trabalho, o meu reconhecimento; de maneira particular, agradeço:

- ao Prof. Dr. Lúcio Sarubbi Fillmann, com extensão ao Serviço de Coloproctologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS), pelo incentivo e auxílio na coleta das amostras;

- ao Prof. Dr. Bernardo Garicochea, bem como à Srta. Silvana Lunardini Alves, ao Dr. Vinicius Schenk Michaelsen e a Srta. Priscila Salvato, do Instituto de Pesquisas Biomédicas do HSL-PUCRS, pela disponibilização das amostras;

- à Profa. Dra. Ilma Simoni Brum da Silva, ao Sr. Vanderlei Biolchi e aos demais colegas do Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET-UFRGS) pelo disponibilidade e auxílio inestimável na execução das técnicas de biologia molecular;

- ao Serviço de Anatomia Patológica e Citopatologia do HSL-PUCRS, pelo exame anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos;

- à Sra. Márcia Anjos, secretária do Serviço de Oncologia do HSL - PUCRS, pelo apoio na revisão dos prontuários médicos;

- à Sra. Estela Maris Araripe, secretária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Cirúrgicas da UFRGS, pela eficiência no atendimento e ajuda na resolução de dificuldades;

- à Sra. Daniela Bumaguin Benzano, bioestatística do Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG-HCPA), pela assessoria estatística;

- às Sras. Noili Demaman e Melissa Moura Mello, da Textual – Português e Literatura, pela revisão de língua portuguesa e normalização da dissertação;
- às bibliotecárias do HSL-PUCRS, Sra. Rosária Maria Lúcia Prenna Geremia, e da ABO/RS, Sra. Silvia Fillmann Teixeira Seelig, pela elaboração da ficha catalográfica e revisão das citações bibliográficas;
- ao Sr. Conor Daly, pela ajuda na tradução do artigo para língua inglesa;
- ao Fundo de Incentivo a Pesquisas e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, pela viabilização da verba necessária para compra dos materiais de consumo.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Representação das etapas da PCR em tempo real	58
Figura 2: Representação da amplificação do gene $\beta 2m$ pela PCR em tempo real ...	59
Figura 3: Representação da curva de <i>meelting</i> do gene $\beta 2m$ pela PCR em tempo real.....	60
Figura 4: Aparelho empregado para execução da PCR em tempo real	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Sistemas de estadiamento do CCR baseados em critérios morfológicos	15
Quadro 2: Sequência de pares de base dos <i>primers sense</i> e <i>antisense</i> dos genes.....	61

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1: Relation between TACSTD2 and mutant KRAS expression and clinical pathological characteristics	84
Table 2: Relation between Ku70 and SERIN1 expression and clinical pathological characteristics	85
Table 3: Quantification of the gene expression in the normal and the tumoral tissues	86

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO EM PORTUGUÊS

Tabela 1: Relação da expressão do TACSTD2 e do KRAS mutante com as variáveis clínico-patológicas.....	107
Tabela 2: Relação da expressão do Ku70 e do SERIN1 com variáveis clínico-patológicas	108
Tabela 3: Quantificação da expressão gênica nos tecidos normal e tumoral.....	109

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
C	Citosina
CCHNP	Câncer colorretal hereditário não-polipóide
CCR	Câncer colorretal
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
C_T	<i>Cycle threshold</i>
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNA-PK	Proteína quinase dependente de DNA
DP	Desvio-padrão
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epitelial
g	Gravidade
G	Guanina
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Trifosfato de guanosina fosfohidrolase
HE	Hematoxilina-eosina
HR	<i>Homologous recombination</i>
HSL-PUCRS	Hospital São Lucas – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
IPB	Instituto de Pesquisas Biomédicas
kb	Quilobase

kDA	Quilodalton
KRAS	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LaBiMET	Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mRNA	Ácido ribonucléico mitocondrial
N/A	Não se aplica
ng/dL	Nanograma por decilitro
NHEJ	<i>Nonhomologous end joining</i>
nm	Nanometro
PAF	Polipose adenomatosa familiar
PCR	Reação em cadeia de polimerase
RNA	Ácido ribonucléico
RT-PCR	PCR a partir da Transcrição Reversa
Rx	Radiografia
SERIN1	<i>Serine incorporator 1</i>
T	Timina
TACSTD2	<i>Tumor-associated calcium signal transducer</i>
TC	Tomografia computadorizada
Tm	Temperatura de <i>meelting</i>
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
UICC	<i>Union Internationale Cotre Cancer</i>
US	Ultrassonografia
β2m	Beta 2 microglubulina
μg	Microgramas

μL	Microlitros
μM	Micromolar
°C	Grau <i>Celsius</i>
°F	Grau <i>Fahrenheit</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	11
1.1 Epidemiologia do Câncer Colorretal	12
1.2 Caracterização do Câncer Colorretal.....	13
1.3 Estadiamento Patológico do Câncer Colorretal	15
1.4 Estadiamento Molecular do Câncer Colorretal	17
1.5 Marcadores Moleculares de Prognóstico do CCR TACSTD2.....	21
2 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	28
3 OBJETIVOS.....	46
3.1 Objetivo Principal.....	47
3.2 Objetivo Secundário.....	47
4 HIPÓTESES.....	48
4.1 Hipótese Nula (H0)	49
4.2 Hipótese Alternativa (H1).....	49
5 PACIENTES E MÉTODOS	50
5.1 Delineamento do Estudo.....	51
5.2 População Estudada.....	51
5.3 Amostra Estudada	52
5.4 Metodologia	52
5.5 Estatística	61
5.6 Ética.....	62
6 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	64
7 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS	87
8 ANEXO.....	110

INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1 INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Epidemiologia do Câncer Colorretal

No Mundo

Anualmente mais de um milhão de indivíduos desenvolvem câncer colorretal (CCR) em todo o mundo⁽¹⁾. Esta cifra representa 11% de todos os cânceres diagnosticados⁽²⁾. Excluindo-se o câncer de pele não-melanoma, o CCR é, em número absoluto e em incidência bruta, o terceiro câncer mais comum. Entre os homens, ocupa a quarta posição, sendo superado apenas pelo câncer de pulmão, de próstata e de estômago. Entre as mulheres, figura em terceiro lugar, atrás do câncer de mama e de cérvix uterina⁽¹⁾.

No Brasil

Estima-se que cerca de 27 mil novos casos de CCR foram diagnosticados no Brasil em 2008⁽³⁾, representando a terceira principal causa de morte por câncer no território nacional⁽⁴⁾. Os estados da região sul são classificados como de elevada incidência para CCR. Neste contexto, o Rio Grande do Sul ocupa lugar de destaque com as maiores taxas de incidência bruta para entre homens (26/ 100.000) e mulheres (28/ 100.000). Entre as capitais, Porto Alegre ocupa a terceira e quarta posições em termos de incidência bruta respectivamente entre homens e mulheres⁽³⁾.

1.2 Caracterização do Câncer Colorretal

Etiopatogenia

Setenta e cinco por cento dos CCRs são esporádicos, sem associação com história familiar, síndrome genética ou doença inflamatória intestinal^(5,6). Nesses casos, a idade é o fator de risco maior importante: noventa por cento dos diagnósticos são feitos em indivíduos acima dos 50 anos de idade⁽²⁾. Outros fatores de risco associados em grau variável ao CCR esporádico incluem história prévia de adenoma ou adenocarcinoma colorretal⁽⁷⁾, exposição à radioterapia pélvica⁽⁸⁾, obesidade⁽⁹⁾, consumo de carne vermelha^(10,11), tabagismo⁽¹²⁾, alcoolismo^(13,14), acromegalia⁽¹⁵⁾ e ureterossigmoidostomia⁽¹⁶⁾. Dados conflitantes sugerem também possível associação com história de colecistectomia^(17,18), atividade física⁽⁷⁾, suplementação com antioxidantes⁽⁷⁾ e consumo de fibras^(7,19), de vegetais^(20,21,22) e de gorduras⁽¹⁹⁾.

Vinte por cento dos CCRs são classificados como câncer familiar comum, isto é, ocorrem em indivíduos com história familiar de CCR e na ausência de qualquer forma de síndrome ou doença colorretal específicas^(5,6,23). Finalmente, o câncer colorretal hereditário não-polipóide (CCHNP) é responsável por outros 4 a 7% dos casos^(5,24), enquanto 1% deve-se à polipose adenomatosa familiar (PAF) e doenças inflamatórias intestinais, principalmente a retocolite ulcerativa⁽⁷⁾.

Anatomopatologia

A distribuição do CCR ao longo do intestino grosso apresenta uma clara predominância pelos segmentos distais⁽²⁵⁾. Aproximadamente, 30% situam-se no reto, 26% no cólon sigmóide, 5% no cólon descendente, 14% no cólon transverso e 25% no cólon ascendente ou ceco^(26,27). Mais de 97% dos CCR são do tipo adenocarcinoma⁽²⁸⁾. O adenocarcinoma colorretal apresenta padrão de disseminação predominante linfático para os gânglios regionais e sanguíneo para o fígado e os pulmões⁽²⁹⁾. Ao diagnóstico, 36 a 40% encontram-se confinados ao intestino grosso, 26 a 36% apresentam metástases em linfonodos regionais e 19 a 30% disseminaram-se à distância^(30,31).

Base Molecular

A carcinogênese é um processo composto por múltiplas etapas e requer o acúmulo de alterações genéticas adquiridas ou herdadas⁽³²⁾. Defeitos em genes que codificam proteínas importantes na regulação do ciclo celular parecem ser essenciais nesse processo⁽¹⁹⁾. Neste contexto, duas vias principais foram identificadas: instabilidade cromossômica e mutação genética. A primeira é responsável pela maior parte dos casos de CCR esporádico e de PAF. Nesta via o acúmulo de mutações em genes supressores (APC, DCC, p53)⁽¹⁹⁾, em oncogenes (KRAS, c-myc, c-erbB2)⁽³³⁾ e outras alterações epigênicas (anormalidades de metilação) conduzem ao CCR⁽³⁴⁾. A segunda, responsável pela instabilidade microssatélite e pelo CCHNP, caracteriza-se por mutações somáticas (inserções e deleções) que levam à instabilidade microssatélite. Mutações somáticas ou germinativas em genes de reparo do ácido desoxirribonucléico (hMLH1, hMSH2)

estão envolvidas neste processo⁽³⁵⁻³⁷⁾. O estudo das vias moleculares e das alterações específicas responsáveis pela progressão desfavorável de pacientes com CCR parece essencial para o desenvolvimento de terapias alvo mais efetivas⁽³⁸⁾.

1.3 Estadiamento Patológico do Câncer colorretal

Evolução Histórica

Coube a Lockhart-Mummery, em 1926, a primeira tentativa de classificação do CCR em estádios⁽³⁹⁾. Em 1932, Cuthbert Dukes, correlacionou a profundidade de invasão e a existência de metástases linfonodais com a sobrevida de pacientes com câncer de reto, criando um sistema de estadiamento de A a C⁽⁴⁰⁾. Em 1939, Simpson e Mayo aplicaram o sistema de Dukes também ao câncer de cólon⁽⁴¹⁾. A seguir, Turnbull introduziu o estágio D para pacientes com disseminação sistêmica⁽⁴²⁾. Na década de 1940, Pierre Denoix aplicou o sistema TNM ao CCR⁽⁴³⁾. Posteriormente, o sistema TNM foi endossado pela *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*⁽⁴⁴⁾ e *Union Internationale Cotre Cancer (UICC)*⁽⁴⁵⁾ (quadro 1).

	TNM		Astler-Coller Modificado		Dukes
Estádio 0	Tis	N0	M0	N/A	N/A
Estádio I	T1	N0	M0	Estádio A	A
	T2	N0	M0	Estádio B1	A
Estádio IIA	T3	N0	M0	Estádio B2	B
Estádio IIB	T4	N0	M0	Estádio B3	B
Estádio IIIA	T1,T2	N1	M0	Estádio C1	C
Estádio IIIB	T3,T4	N1	M0	Estádio C2,C3	C
Estádio IIIC	Qualquer T	N2	M0	Estádio C1,C2,C3	C
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	Estádio D	N/A

CA Cancer J Clin 2004; 54:295-308 © (2004)

Quadro 1: Sistemas de estadiamento do CCR baseados em critérios morfológicos

Outras Variáveis de Prognóstico

Variáveis clínico-laboratoriais como obstrução intestinal e dosagem pré-operatória de antígeno carcinoembriônico (CEA) elevada (maior que 3 ou 5 ng/mL) são associadas com pior prognóstico⁽⁴⁶⁻⁴⁹⁾. Além disso, tumores de alto grau (pouco diferenciados ou indiferenciados)⁽⁵⁰⁾, com subtipos histológicos específicos (células em anel de sinete, carcinoma mucinoso)⁽⁵¹⁾, com invasão microscópica de tecido neural e/ou vasos sanguíneos ou linfáticos⁽⁵²⁻⁵⁶⁾ e não-diplóides⁽⁵⁷⁾ também são associados com prognóstico ruim.

Limitações e Desvantagens

Mesmo com os avanços nas últimas décadas, os exames atualmente disponíveis para o estadiamento clínico do CCR ainda apresentam limitações na determinação da extensão do tumor primário, bem como da existência de metástases linfonodal e hepática⁽⁵⁸⁾. Apesar de uma suposta ressecção curativa, cerca de 50% dos pacientes morrem nos primeiros cinco anos de seguimento, sendo que 80% destes apresentam recorrência clinicamente detectável nos primeiros dois anos⁽⁵⁹⁾. Sabe-se que 20 a 40% dos pacientes com estadiamento patológico linfonodal negativo morrem de CCR recorrente⁽⁶⁰⁾.

1.4 Estadiamento Molecular do Câncer Colorretal

Fundamentação

Estima-se que cada molécula de ácido desoxirribonucléico (DNA) contenha cerca de 40.000 genes, dos quais apenas 10.000 participam da expressão gênica de cada célula. Embora o DNA nuclear contido nas células somáticas seja exatamente o mesmo independentemente do tipo de tecido, o padrão de expressão para síntese protéica é bastante variável. Da mesma forma que os perfis genômico e protéico determinam a estrutura e definem o comportamento biológico dos tecidos normais, o mesmo ocorre nos tumores⁽⁶¹⁾.

Com os recentes progressos da biologia molecular, a pesquisa de fatores prognósticos se estendeu para as proteínas e os genes envolvidos na carcinogênese. O desenvolvimento de novos métodos de análise da expressão gênica, em particular das técnicas de microarranjos de tecidos e de DNA, tornou possível o estudo simultâneo da expressão de milhares de genes. No CCR foram comparadas, inicialmente, as expressões gênicas da mucosa colônica normal e de adenocarcinomas⁽⁶¹⁾. Takemasa⁽⁶²⁾ identificou 59 genes com expressão gênica diferenciada em um total de 4.608 estudados. Stremmel⁽⁶³⁾ observou diferenças entre 100 a 500 genes em mais de 6.000 analisados. Seguindo metodologia semelhante, Kitahara⁽⁶⁴⁾ relatou expressão diferente entre tecidos normal e tumoral em 235 genes de um total de 9.126 estudados. Outros autores identificaram alterações de expressão gênica entre estágios distintos da sequência da evolução do adenoma ao adenocarcinoma. Lin⁽⁶⁵⁾ identificou 50 genes entre 23.040

estudados, que foram utilizados como escore para diferenciação entre adenomas e adenocarcinomas colorretais. Por fim, Hegde⁽⁶⁶⁾ observou a expressão diferenciada de 176 em um total de 19.200 genes estudados em pacientes com CCR metastático, relacionando-os ao pior comportamento biológico destes tumores.

Panorama Atual

Nos últimos anos, tem-se observado a publicação de um grande número de pesquisas que investigam marcadores moleculares potencialmente associados ao prognóstico dos mais diversos tipos de cânceres. No CCR, este fenômeno é particularmente mais intenso. Estudos de coorte histórica envolvendo pacientes com câncer de cólon⁽⁶⁷⁾, reto⁽⁶⁸⁾ ou ambos⁽⁶⁹⁾, na sua imensa maioria estádios clínicos II e III, demonstraram, de forma estatisticamente significativa, o prognóstico favorável da instabilidade microssatélite e da ausência de expressão do MLH1 e MSH2^(67,69). Embora ainda exista controvérsia acerca do efeito prognóstico dos genes p53^(59,70-72) e APC^(59,71) parece bem estabelecida a associação da mutação do KRAS com prognóstico desfavorável^(73,74), menor sobrevida⁽⁷³⁻⁷⁷⁾ ou pior resposta ao tratamento com terapia alvo^(78,79). Não obstante, o prognóstico de pacientes com CCR também tem sido relacionado à expressão de outros genes: bcl-2^(71,80), Ku70^(81,82), C-erb-2⁽⁸³⁾, E-caderina⁽⁸³⁾, matrilisina⁽⁸⁴⁾, fascina⁽⁸⁵⁾, trombomodulina⁽⁸⁶⁾, beta-catenina⁽⁸⁷⁾, p27⁽⁸⁷⁾, 5-lipoxigenase⁽⁸⁸⁾, Cox-2⁽⁸⁸⁾, UDP-N-acetyl-alfa-D-galactosamine-polypeptide GalNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3⁽⁸⁹⁾, DDC⁽⁷⁰⁾, b-raf⁽⁷⁹⁾, epiregulina⁽⁷⁸⁾, anfiregulina⁽⁷⁸⁾, TACSTD2⁽⁹⁰⁾ e RHOA⁽⁷⁷⁾.

Atualmente, com o objetivo de melhorar a sobrevida de pacientes com CCR, tem-se proposto a associação da quimioterapia convencional com terapias-alvo, tais

como aquelas que atuam diretamente nas vias de sinalização do *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) e do *Epidermal Growth Factor* (EGFR). No entanto, há variabilidade de resposta clínica a tais agentes e o incremento das taxas de sucesso do tratamento do CCR requer a melhor compreensão do comportamento e do desenvolvimento tumorais. Estudos moleculares mostraram que a história natural dos CCRs não é idêntica, suscitando a necessidade de identificação de marcadores de comportamento biológico e prognóstico confiáveis e com maior acurácia em prever o prognóstico e selecionar adequadamente pacientes que se beneficiem de terapias alvo^(59,100).

Banco de Tecidos

Amostras teciduais arquivadas geralmente são armazenadas em blocos de parafina após fixação em formalina. A formalina determina a fragmentação do RNA, dificultando a utilização destes tecidos em pesquisas que empregam técnicas de biologia molecular desenvolvidas para análise de expressão gênica. Isto tem motivado, nos últimos anos, a criação de bancos de tecidos congelados e não-fixados. O congelamento de amostras teciduais imediatamente após a ressecção do espécime cirúrgico e o seu armazenamento a - 80°C são os procedimentos padrão de conservação. Períodos *ex-vivo* prolongados antes do congelamento comprometem a integridade do RNA e a expressão do mRNA, podendo interferir na expressão gênica⁽⁹²⁾. Em associação às informações clínico-patológicas, os bancos de tecidos constituem fonte de material biológico para pesquisa em cancerologia, principalmente para estudos em carcinogênese e prognóstico tumoral^(92,93).

Reação em Cadeia de Polimerase em Tempo Real

A técnica da reação em cadeia de polimerase (PCR), desenvolvida por Kary Mullis nos anos 80, é um método de pesquisa em biologia molecular que tornou possível a síntese *in vitro* de fragmentos de DNA. Uma das aplicações especialmente úteis da PCR é o estudo da expressão de genes em oncologia. A monitorização da PCR em tempo real por meio de fluorescência permite a quantificação de fragmentos de DNA e de ácido ribonucleico (RNA) de forma mais precisa e com maior reprodutibilidade.

A técnica da PCR exige, inicialmente, a síntese de DNA complementar (cDNA) a partir do RNA mensageiro (mRNA) obtido de uma determinada amostra biológica através da utilização da enzima transcriptase reversa, uma DNA polimerase. A PCR em tempo real é realizada em um termociclador especial através da adição de oligonucleotídeos iniciadores (diretos e reversos), um fluoróforo (molécula que absorve e emite luz em um comprimento de onda específico) e o cDNA obtido previamente. Para quantificação da expressão do gene em estudo, a PCR em tempo real se vale da fluorescência emitida continuamente ao longo dos vários ciclos do protocolo de reações. A emissão dos compostos fluorescentes gera um sinal que aumenta na proporção direta da quantidade de produto da PCR. Sendo assim, os valores da fluorescência são gravados durante cada ciclo e representam a quantidade de produto amplificado. O ponto que detecta o ciclo na qual a reação atinge o limiar da fase exponencial é denominado de *cycle threshold* (C_T)⁽⁹⁴⁾.

1.5 Marcadores moleculares de prognóstico do CCR

TACSTD2

O *tumor-associated calcium signal transducer* (TACSTD2) também denominado M1S1 (*surface marker 1*), TROP2, EGP-1 e GA733-1 foi clonado pela primeira vez por Fornaro, em 1995^(95,96). Este gene que tem apenas um éxon se localiza no braço curto do cromossomo 1 (1p32-1p31) e estende-se por 1,8 kb do DNA genômico. O TACSTD2 codifica uma proteína de 323 aminoácidos, cuja massa molecular é de 40 kDa. Trata-se de uma glicoproteína transmembrana tipo 1 com uma sequência sinal N-terminal de exportação, uma repetição *EGF-like*, uma repetição tireoglobulina e um sítio de ligação para o fosfatidilinositol (PIP2). Anteriormente considerada um receptor de adesão celular, acredita-se hoje, com base na sua estrutura, que participe da transdução de sinal celular⁽⁹⁷⁾.

A superexpressão do TACSTD2 tem sido observada na maior parte dos carcinomas humanos e proposta como possível estimuladora do crescimento e desenvolvimento tumoral. Esta ação estimuladora depende da existência do sítio de fosforilação da proteína quinase S303 na região citoplasmática do gene, bem como da sinalização intacta da proteína quinase C⁽⁹⁶⁻⁹⁸⁾. Recentes estudos têm considerado o TACSTD2 como um biomarcador de agressividade tumoral e prognóstico desfavorável em pacientes com carcinoma de pâncreas⁽⁹⁹⁾, esôfago⁽¹⁰⁰⁾, cavidade oral⁽¹⁰¹⁾, ovário⁽¹⁰²⁾, bexiga⁽¹⁰³⁾, mama e intestino grosso⁽⁹⁰⁾.

Ohmachi demonstrou que a expressão do TACSTD2 no CCR encontra-se aumentada 8,34 vezes ($p < 0,0001$) em relação ao tecido normal pela técnica da PCR. Observou também associação estatisticamente significativa entre a expressão

elevada do TACSTD2 e metástase hepática, sobrevida geral (48,5% vs 83,3% / $p = 0,0036$) e morte relacionada ao CCR. Em contraste aos carcinomas, o epitélio normal apresenta pouca ou nenhuma expressão deste gene⁽⁹⁰⁾. Em razão disso, o TACSTD2 representa um atrativo alvo terapêutico no CCR⁽⁹⁵⁾.

Ku70

O reparo de quebras da dupla fita de DNA é essencial para a sobrevivência celular. Este processo, aparentemente, envolve duas vias distintas: *homologous recombination* (HR) e *nonhomologous end joining* (NHEJ). Recentes evidências indicam a proteína quinase dependente de DNA (DNA-PK) como componente central da via NHEJ. A DNA-PK é composta por uma grande subunidade catalítica de 465 kDa (DNA-PKcs) e uma unidade de ligação ao DNA, um heterodímero composto de duas subunidades, Ku70 e Ku80, respectivamente com massa molecular de 70 e 86 kDa, responsáveis pela estabilização da DNA-PKcs⁽¹⁰⁴⁾. Uma vez ligado ao ponto de quebra da molécula de DNA, o heterodímero Ku70-80 evita a degradação da mesma por exonucleases e promove o recrutamento da subunidade catalítica PKcs ao local, formando o complexo DNA-PK⁽¹⁰⁵⁾. A DNA-PK promove o reparo do DNA por meio de fosforilação dos aminoácidos treonina e serina e da ativação de outras enzimas nucleares de recombinação e reparo⁽¹⁰⁶⁾.

O gene responsável pela codificação da proteína antiapoptótica Ku70 (XRCC6, *x-ray repair complementing defective repair in chinese hamster cells 6*) localiza-se no braço longo do cromossomo 22 (22q13.2-q13.31). No núcleo, a proteína Ku exerce papel fundamental no reparo de quebras do DNA decorrentes de irradiação ionizante, de certas drogas antineoplásicas (bleomicina, etoposide,

adriamicina) e de reparos ocorridos durante inúmeros processos de recombinação celular incluindo o rearranjo do gene antígeno-receptor (recombinações V(D)J)⁽¹⁰⁷⁻¹¹²⁾. Embora predominantemente nuclear, diversas publicações documentaram a presença de ambas subunidades Ku no citoplasma⁽¹¹²⁾. Evidências sugerem a interação das subunidades KU com a Bax, ciclina E, Hp1 α , TRF2, MRE11, p95^{VAV}, apolipoproteína J e outras proteínas não identificadas⁽¹¹³⁾. Estudo de Lee demonstrou que células HT-29 e HCT-116 de CCR transplantadas em camundongos NOD-SCID (*nonobese diabetes/severe combined immunodeficiency*) tratados com Justicidina A via oral apresentavam redução dos níveis citoplasmáticos da proteína Ku70, com conseqüente elevação dos níveis mitocondriais de Bax e estimulação da apoptose celular⁽¹¹⁴⁾. Resultado semelhante foi observado em trabalho de Rashmi que demonstrou a relação entre a subexpressão citoplasmática da Ku70 com a superexpressão da Bax mitocondrial e conseqüente indução da apoptose em cultura de células da linhagem SW480 de CCR humano expostas à curcumina⁽¹¹⁵⁾.

Estudo de Parrella documentou a relação entre a expressão imunistoquímica elevada das subunidades Ku70 e Ku80 com a taxa de proliferação celular de carcinomas espinocelular e basocelular de pele em humanos, sugerindo a influência destas proteínas na instabilidade genômica e na progressão tumoral⁽¹¹⁶⁾. Komuro demonstrou que a expressão do Ku70 associa-se de forma estatisticamente significativa e independente com menor sobrevida livre de doença em pacientes com CCR⁽⁸¹⁾ e com menor sobrevida livre de doença e resposta ruim à radioterapia em pacientes com câncer de reto⁽⁸²⁾.

SERIN1

O gene *serine incorporator 1* (SERIN1) também conhecido como KIAA1253, localiza-se no braço longo do cromossomo 6 (6q22.31). O SERIN1 codifica uma família de proteínas que incorporam serina na membrana celular e formam complexos intracelulares com enzimas essenciais para a biosíntese de fosfatidilserina e esfingolípídeo. Eschrich, empregando a técnica de microarranjo de cDNA, demonstrou que pacientes com CCR apresentam expressão elevada de SERIN1. Neste estudo, juntamente com outros 45 genes, o SERIN1 compôs um painel com 90% de acurácia na predição da sobrevida geral em 36 meses de 78 pacientes com CCR⁽¹¹⁷⁾.

KRAS

O gene *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog* (KRAS, V-Ki-ras2) localiza-se no braço curto do cromossomo 12 (12p12.1). Até o momento, três genes RAS foram identificados: homólogo ao oncogene do vírus do sarcoma de ratos *Harvey* (HRAS), KRAS2 (homólogo ao oncogene do vírus do sarcoma de ratos *Kirsten*) e NRAS (primeiramente isolado de um neuroblastoma humano). Dos três genes, o KRAS é o mais frequentemente mutado⁽¹¹⁸⁾. Os genes RAS codificam proteínas de ligação do nucleotídeo guanina associada à membrana. Possuem massa molecular de 21 kDa, sendo por tal razão chamadas de p21^{ras(75,119,120)}. Trata-se de proteínas monoméricas com homologia de 90% que possuem em comum o domínio efetor N-terminal. As proteínas RAS existem em dois estados: (1) ativa, na qual se encontra ligada à molécula de trifosfato de guanossina (GTP) e (2) inativa,

quando a GTP foi hidrolisada a difosfato de guanosina (GDP). Em condições fisiológicas, a isoforma ativa inicia a proliferação celular através da cascata da quinase dependente de RAS. As proteínas RAS possuem atividade GTPase intrínseca que, geralmente, leva à sua inativação e ao controle do crescimento celular. Em tumores, mutações pontuais envolvendo o domínio de ligação da GTP (códon 12 e 13) ou o domínio da GTPase (códon 61) determinam ativação constitutiva da proteína, com perda da atividade intrínseca da GTPase e impedimento do bloqueio da sinalização que estimula o crescimento, a proliferação e a diferenciação celulares. Como consequência, ocorre proliferação celular descontrolada, transformação maligna e desenvolvimento tumoral mesmo na ausência de estímulo extra-celular^(38,75,119,120). Sabe-se que a proteína RAS ocupa uma posição chave na via de sinalização do EGFR. Na superfície interna da membrana plasmática, o domínio de ligação da GTP da KRAS encontra-se acoplado a receptores de tirosina-quinase como o EGFR através de complexos intermediários de proteínas SOS2 e GRB. Outros elementos envolvidos nesta via de sinalização incluem RAF treonina-serina-quinase citoplasmática e a cascata da proteína de ativação da mitose. Embora mutações KRAS sejam observadas em mucosa normal, parecem ocorrer apenas em mucosa displásica com mutação APC coexistente. Isto suporta a noção de que mutações KRAS não conferem vantagem de crescimento na ausência de mutação APC⁽⁵⁹⁾.

Mutações dos genes RAS são observadas em cerca de 30% das neoplasias malignas humanas, com extrema variabilidade de acordo com o tipo e sítio do tumor⁽⁷⁵⁾. Mutações KRAS são associadas com comportamento agressivo e pior prognóstico de carcinoma de tireóide⁽¹²⁰⁾, adenocarcinoma colorretal^(76,121) e carcinoma não-pequenas células de pulmão⁽¹¹⁹⁾.

Vogelstein foi o primeiro a sugerir o envolvimento da mutação do KRAS nas etapas iniciais da carcinogênese colorretal, ocorrida mais frequentemente na transformação de um pequeno adenoma em um adenoma grande e displásico⁽⁷⁵⁾. Hoje se sabe que mutações do KRAS ocorrem em estágios precoces da progressão do adenoma ao adenocarcinoma em cerca de 40% (30 a 60%) dos casos^(38,73,75, 76), sendo mais comuns em lesões grandes e avançadas⁽⁵⁹⁾. A maior parte das mutações (90%) localiza-se nos códons 12 e 13 e menos frequentemente no códon 61⁽⁷⁵⁾. Transição de guanina para adenina e transversão de guanina para timina são os tipos mais comuns em pacientes com CCR⁽¹²²⁾.

Nos últimos anos, diversos estudos têm investigado a significado das mutações do KRAS no prognóstico de pacientes com CCR. Estudo multicêntrico envolvendo 3439 pacientes de 21 países demonstrou associação estatisticamente significativa entre sobrevida geral e sobrevida livre de doença com uma mutação glicina – valina no códon 12 do gene KRAS de pacientes com CCR Dukes C⁽⁷⁶⁾. Com base nos estudos RASCAL I e II, acredita-se que algumas mutações específicas determinam comportamento particularmente mais agressivo que outras⁽¹²³⁾.

Diversos estudos recentes têm demonstrado que a mutação KRAS é um fator preditivo de resistência ao uso do anti-EGFR mAbs isolado ou em combinação com irinotecan em pacientes com CCR refratários a este quimioterápico⁽¹²⁴⁾. Em sua análise, Ince observou mutação do KRAS em 35% das amostras de CCR primário ou secundário de pacientes incluídos no ensaio clínico multicêntrico que comparou diferentes esquemas de tratamento com quimioterapia e terapia alvo adjuvante. Neste estudo, pacientes sem mutação do KRAS apresentaram melhor sobrevida independentemente do regime de tratamento oferecido⁽⁷⁹⁾. Trabalho de Khabata–Ford detectou mutações no éxon 2 (códons 12 e 13) do KRAS em 38% de 80

amostras de CCR. O KRAS mutante foi identificado respectivamente em 11% e 53% do grupo de pacientes respondedores e não respondedores ao tratamento com Cetuximab®. Este dado sugere que a mutação do KRAS associa-se à refratariedade à terapia com Cetuximab®⁽⁷⁸⁾. Di Fiore, estudando pacientes com CCR metastático, também documentou que a mutação do KRAS é preditiva da falha de resposta clínica ao tratamento com quimioterapia associada a Cetuximab®⁽⁹¹⁾.

REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

2 REFERÊNCIAS DA INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA

1. CANCERmondial [homepage on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; c2005 [citado 2010 Jan 4]. Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr/>
2. American Cancer Society [Internet]. Cancer facts & figures 2004. Atlanta (GA): The Society; c2010 [citado 2010 Jan 4]. [58 p.] Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2004PWSecured.pdf>
3. Instituto Nacional do Câncer [homepage na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; c1996-2009. [citado 2010 jan 4]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>
4. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer 2003. Rio de Janeiro: INCA; 2003. [92 p.]. [citado 2010 jan 4]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2003/versaofinal.pdf>
5. Read TE, Caushaj PF. Screening for colorectal neoplasms. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. The ASCRS textbook of colon and rectal surgery. New York (NY): Springer; 2007. p.353–61.
6. Nivatvongs S. Treatment of colorectal adenomas: (including screening, follow-up, and surveillance). In: Fazio VW, Church JM, Delaney CP. Current therapy in colon and rectal surgery. 2nd.ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2005. p.331–42.
7. Hill LB, O'Connell JB, Ko CY. Colorectal cancer: epidemiology and health services research. Surg Oncol Clin N Am. 2006;15(1):21–37.

8. Jao SW, Beart RW Jr, Reiman HM, Gunderson LL, Ilstrup DM. Colon and anorectal cancer after pelvic irradiation. *Dis Colon Rectum*. 1987;30(12):953-8
9. Giovannucci E. Diet, body weight and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J Womens Health (Larchmt)*. 2003;12(2):173-82.
10. Sandhu MS, White IR, McPherson K. Systematic review of the prospective cohort studies on meat consumption and colorectal cancer risk: a meta-analytical approach. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(5):439-46.
11. Norat T, Lukanova A, Ferrari P, Riboli E. Meat consumption and colorectal cancer risk: dose-response meta-analysis of epidemiological studies. *Int J Cancer*. 2002;98(2):241-56.
12. Giovannucci E. An updated review of the epidemiological evidence that cigarette smoking increases risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001;10(7):725-31.
13. Longnecker MP, Orza MJ, Adams ME, Vioque J, Chalmers TC. A meta-analysis of alcoholic beverage consumption in relation to risk of colorectal cancer. *Cancer Causes Control*. 1990;1(1):59-68.
14. Cho E, Smith-Warner SA, Ritz J, van den Brandt PA, Colditz GA, Folsom AR, et al. Alcohol intake and colorectal cancer: a pooled analysis of 8 cohort studies. *Ann Intern Med*. 2004;140(8):603-13.
15. Orme SM, McNally RJ, Cartwright RA, Belchetz PE. Mortality and cancer incidence in acromegaly: a retrospective cohort study. United Kingdom Acromegaly Study Group. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998;83(8):2730-4.

16. Woodhouse CR, British Society for Gastroenterology, Association of Proctology for Great Britain and Ireland. Guidelines for monitoring of patients with ureterosigmoidostomy. *Gut*. 2002;51(suppl 5):V15-6.
17. Giovannucci E, Colditz GA, Stampfer MJ. A meta-analysis of cholecystectomy and colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1993;105(1):130-41.
18. Schernhammer ES, Leitzmann MF, Michaud DS, Speizer FE, Giovannucci E, Colditz GA, et al. Cholecystectomy and the risk for developing colorectal cancer and distal colorectal adenomas. *Br J Cancer*. 2003;88(1):79-83.
19. Baxter NN, Guillem JG. Colorectal cancer: epidemiology, etiology and molecular basis. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. *The ASCRS textbook of colon and rectal surgery*. New York (NY): Springer; 2007. p.335–52.
20. Trock B, Lanza E, Greenwald P. Dietary fiber, vegetables, and colon cancer: critical review and meta-analyses of the epidemiologic evidence. *J Natl Cancer Inst*. 1990;82(8):650-61.
21. Steinmetz KA, Potter JD. Vegetables, fruit and cancer prevention: a review. *J Am Diet Assoc*. 1996;96(10):1027-39.
22. World Cancer Research Foundation. *Food, nutrition and the prevention of cancer: a global perspective*. Washington (DC): American Institute for Cancer Research; 1997. 670 p.
23. Harford WV. Colorectal cancer screening and surveillance. *Surg Oncol Clin N Am*. 2006;15(1):1–20.

24. Lin KM, Thorson AG. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer. In: Fazio VW, Church JM, Delaney CP. Current therapy in colon and rectal surgery. 2nd.ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2005. p.379–88.
25. Gomez D, Dalal Z, Raw E, Roberts C, Lyndon PJ. Anatomical distribution of colorectal cancer over a 10 year period in a district general hospital: is there a true “rightward shift”? Postgrad Med J. 2004;80(949):667–9.
26. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. Dis Colon Rectum. 1998;41(4):428-33.
27. Cancer Research UK.org [Internet]. Cancer stats: bowel (colorectal) cancer. London: The Organization; c2009. [citado 2010 Jan 4] Available at: http://publications.cancerresearchuk.org/WebRoot/crukstoredb/CRUK_PDFs/bowel/cs_bo_f1.1.xls
28. Disario JA, Burt RW, Kendrick ML, McWhorter WP. Colorectal cancers of rare histologic types compared with adenocarcinomas. Dis Colon Rectum. 1994;37(12):1277-80.
29. Williams NS. Câncer colorretal: epidemiologia, etiologia, patologia, manifestações clínicas e diagnóstico. In: Keighley MRB, Williams NS. Cirurgia: o ânus, reto e colo. São Paulo: Manole; 1998. p.791-843.
30. Cancer Research UK.org [Internet]. Bowel cancer – survival statistics. London: The Organization; c2009. [updated 2009 June 23; citado 2010 Jan 4]. [about 9 screens]. Disponível em: <http://info.cancerresearchuk.org/cancerstats/types/bowel/survival/>

31. U.S.National Institutes of Health/www.cancer.gov. [Internet]. Surveillance Epidemiology and End Results: Cancer Statistics. Cancer: Colon and rectum. Bethesda(MD): The Institutes; c2009. [updated 2009 Sep 24]. [about 5 screens.] Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/colorect.html>
32. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000;100(1):57-70.
33. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. Ann Intern Med. 2002;137(7):603-12.
34. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell. 1990;61(5):759-67.
35. 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.
36. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition: update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. Dis Markers. 2004;20(4-5):269-76.
37. Yamamoto H, Sawai H, Weber TK, Rodriguez-Bigas MA, Perucho M. Somatic frameshift mutations in DNA mismatch repair and proapoptosis genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer Res. 1998;58(5):997-1003.

38. Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, et al. Prognostic significance of microsatellite instability and Ki-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology*. 2003;64(3):259-65.
39. Lockhart-Mummery JP. Two hundred cases of cancer of the rectum treated by perineal excision. *Br J Surg*. 1926;14(53):110-24.
40. Dukes CE. The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol*. 1932;35:323-32.
41. Simpson WC, Mayo CW. The mural penetration of the carcinoma cell in the colon: anatomic and clinical study. *Surg Gynecol Obstet*. 1939;68:872-7.
42. Turnbull RB Jr, Kyle K, Watson FR, Spratt J. Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Ann Surg*. 1967;166(3):420-7.
43. Sobin LH, Wittekind Ch. The history of the TNM system. In: Sobin LH, Wittekind C, editors. *TNM classification of malignant tumours*. 5th ed. New York: John Wiley & Sons; 1997. p.1-4.
44. American Joint Committee on Cancer. Collaborative Staging Task Force of the American Joint Committee on Cancer. *Collaborative Staging Manual and Coding Instructions, version 1.0*. and U.S. NIH Publication Number 04-5496. [citado 2010 jan 7]. Disponível em: <http://www.cancerstaging.org/cstage/csmanualpart1.pdf>
45. Sobin LH, Wittekind Ch, editors. *TNM classification of malignant tumors*. 6th.ed. New York: Wiley, 2002.
46. Ohman U. Prognosis in patients with obstructing colorectal carcinoma. *Am J Surg*. 1982;143(6):742-747.

47. Mulcahy HE, Skelly MM, Husain A, O'Donoghue DP. Long-term outcome following curative surgery for malignant large bowel obstruction. *Br J Surg.* 1996;83(1):46-50.
48. Harrison LE, Guillem JG, Paty P, Cohen AM. Preoperative carcinoembryonic antigen predicts outcome in node-negative colon cancer patients: a multivariate analysis of 572 patients. *J Am Coll Surg.* 1997;185(1):55-5.
49. Compton C, Fenoglio-Preiser CM, Pettigrew N, Felding LP. American Joint Committee on cancer prognostic factors consensus conference. Colorectal Working Group. *Cancer.* 2000;88(7):1739-57.
50. Cooper HS, Slemmer JR. Surgical pathology of carcinoma of the colon and rectum. *Semin Oncol.* 1991;18(4):367-80.
51. Bittorf B, Merkel S, Matzel KE, Wein A, Dimmler A, Hohenberger W. Primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum. *Langenbecks Arch Surg.* 2004;389(3):178-83.
52. Blumberg D, Paty PB, Guillem JG, Picon AI, Minsky BD, Wong WD, et al. All patients with small intramural rectal cancers are at risk for lymph node metastasis. *Dis Colon Rectum.* 1999;42(7):881-5.
53. Enker WE. The elusive goal of preoperative staging in rectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2004;11(3):245-6.
54. Sengupta S, Tjandra JJ. Local excision of rectal cancer: what is the evidence? *Dis Colon Rectum.* 2001;44(9):1345-61.
55. Minsky BD, Mies C, Recht A, Rich TA, Chaffey JT. Resectable adenocarcinoma of the rectosigmoid and rectum. II. The influence of blood vessel invasion. *Cancer.* 1988;61(7):1417-24.

56. Knudsen JB, Nilsson T, Sprechler M, Johansen A, Christensen N. Venous and nerve invasion as prognostic factors in postoperative survival of patients with resectable cancer of the rectum. *Dis Colon Rectum*. 1983;26(9):613-7.
57. Scott NA, Rainwater LM, Wieand HS, Weiland LH, Pemberton JH, Beart RW Jr, et al. The relative prognostic value of flow cytometric DNA analysis and conventional clinicopathologic criteria in patients with operable rectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 1987;30(7):513-20.
58. McCormick JT, Gregorcyk SG. Preoperative evaluation of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2006;15(1):39-49.
59. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001;54(4):206-14.
60. Cohen AM, Kelsen D, Saltz L, Minsky BD, Nelson H, Farouk R, et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer. *Curr Probl Surg*. 1997;34(8):601-76.
61. Pinho MSL. Estadiamento molecular do câncer colorretal: o futuro se aproxima. *Rev Bras Coloproct*. 2005;25(3):279-84.
62. Takemasa I, Higuchi H, Yamamoto H, Sekimoto M, Tomita N, Nakamori S, et al. Construction of preferential cDNA microarray specialized for human colorectal carcinoma: molecular sketch of colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001;285(5):1244-9.
63. Stremmel C, Wein A, Hohenberger W, Reingruber B. DNA microarrays: a new diagnostic tool and its implications in colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis*. 2002;17(3):131-6.
64. Kitahara O, Furukawa Y, Tanaka T, Kihara C, Ono K, Yanagawa R, et al. Alterations of gene expression during colorectal carcinogenesis revealed by

- cDNA microarrays after laser-capture microdissection of tumor tissues and normal epithelia. *Cancer Res.* 2001;61(9):3544-9.
65. Lin YM, Furukawa Y, Tsunoda T, Yue CT, Yang KC, Nakamura Y. Molecular diagnosis of colorectal tumors by expression profiles of 50 genes expressed differentially in adenomas and carcinomas. *Oncogene.* 2002;21(26):4120-8.
 66. Hegde P, Qi R, Gaspard R, Abernathy K, Dharap S, Earle-Hughes J, et al. Identification of tumor markers in models of human colorectal cancer using a 19,200-element complementary DNA microarray. *Cancer Res.* 2001;61(21):7792-7.
 67. Sinicrope FA, Rego RL, Halling KC, Foster N, Sargent DJ, La Plant B, et al. Prognostic impact of microsatellite instability and DNA ploidy in human colon carcinoma patients. *Gastroenterology.* 2006;131(3):729-37.
 68. Colombino M, Cossu A, Manca A, Dedola MF, Giordano M, Scintu F, et al. Prevalence and prognostic role of microsatellite instability in patients with rectal carcinoma. *Ann Oncol.* 2002;13(9):1447-53.
 69. Lanza G, Gafà R, Santini A, Maestri I, Guerzoni L, Cavazzini L. Immunohistochemical test for MLH1 and MSH2 expression predicts clinical outcome in stage II and III colorectal cancer patients. *J Clin Oncol.* 2006;24(15):2359-67.
 70. Munro AJ, Lain S, Lane DP. P53 abnormalities and outcomes in colorectal cancer: a systematic review. *Br J Cancer.* 2005;92(3):434-44.
 71. Lustosa SA, Logullo A, Artigiani R, Saad SS, Goldenberg A, Matos D. Analysis of the correlation between p53 and bcl-2 expression with staging and prognosis of the colorectal adenocarcinoma. *Acta Cir Bras.* 2005;20(5):353-7.

72. González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*. 2004;27(1):39-45.
73. Dieterle CP, Conzelmann M, Linnemann U, Berger MR. Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for K-ras mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2004;10(2):641-50.
74. Anwar S, Frayling IM, Scott NA, Carlson GL. Systematic review of genetic influences on the prognosis of colorectal cancer. *Br J Surg*. 2004;91(10):1275-91.
75. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol*. 2002;13(9):1438-46.
76. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001;85(5):692-6.
77. Arango D, Laiho P, Kokko A, Alhopuro P, Sammalkorpi H, Salovaara R, et al. Gene-expression profiling predicts recurrence in Dukes' C colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2005;129(3):874-84.
78. Khambata-Ford S, Garrett CR, Meropol NJ, Basik M, Harbison CT, Wu S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007;25(22):3230-7.

79. Ince WL, Jubb AM, Holden SN, Holmgren EB, Tobin P, Sridhar M, et al. Association of k-ras, b-raf, and p53 status with the treatment effect of bevacizumab. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97(13):981-9.
80. Bendardaf R, Ristamäki R, Kujari H, Laine J, Lamlum H, Collan Y, et al. Apoptotic index and bcl-2 expression as prognostic factors in colorectal carcinoma. *Oncology.* 2003;64(4):435-42.
81. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Suzuki N, et al. Prognostic significance of Ku70 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology.* 2005;52(64):995-8.
82. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer.* 2002;95(6):1199-205.
83. Jesus EC, Matos D, Artigiani R, Waitzberg AF, Goldenberg A, Saad SS. Assessment of staging, prognosis and mortality of colorectal cancer by tumor markers: receptor erbB-2 and cadherins. *Acta Cir Bras.* 2005;20(6):422-7.
84. Kurokawa S, Arimura Y, Yamamoto H, Adachi Y, Endo T, Sato T, et al. Tumour matrilysin expression predicts metastatic potential of stage I (pT1) colon and rectal cancers. *Gut.* 2005;54(12):1751-8.
85. Puppa G, Maisonneuve P, Sonzogni A, Masullo M, Chiappa A, Valerio M, et al. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage III-IV colonic adenocarcinoma. *Br J Cancer.* 2007;96(7):1118-26.

86. Hanly AM, Redmond M, Winter DC, Brophy S, Deasy JM, Bouchier-Hayes DJ, et al. Thrombomodulin expression in colorectal carcinoma is protective and correlates with survival. *Br J Cancer*. 2006;94(9):1320-5.
87. Cheah PY, Choo PH, Yao J, Eu KW, Seow-Choen F. A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with beta-catenin and p27kip1. *Cancer*. 2002;95(12):2479-86.
88. Barresi V, Grosso M, Vitarelli E, Tuccari G, Barresi G. 5-Lipoxygenase is coexpressed with Cox-2 in sporadic colorectal cancer: a correlation with advanced stage. *Dis Colon Rectum*. 2007;50(10):1576-84.
89. Shibao K, Izumi H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M, et al. Expression of UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine-polypeptide galNAc N-acetylgalactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer*. 2002;94(7):1939-46.
90. Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12(10):3057-63.
91. Di Fiore F, Blanchard F, Charbonnier F, Le Pessot F, Lamy A, Galais MP, et al. Clinical relevance of KRAS mutation detection in metastatic colorectal cancer treated by Cetuximab plus chemotherapy. *Br J Cancer*. 2007;96(8):1166-9.
92. Carvalho L, Bernardo MT, Tavares M, Cotovio P, Mação P, Oliveira C. Banco de tumores: imperativo em medicina. *Acta Med Port*. 2007;20(4):325-34.

93. Ambrosone CB, Nesline MK, Davis W. Establishing a cancer center data bank and biorepository for multidisciplinary research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(9):1575-7.
94. Novais CM, Pires-Alves M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. *Rev Biotecnol Ciên Desenvolv [Internet].* 2004 jul/dez [citado 2010 jan 5];33:10–3. Disponível em: <http://www.biotecnologia.com.br/revista/bio33/bio33.pdf>
95. Wang J, Day R, Dong Y, Weintraub SJ, Michel L. Identification of Trop-2 as an oncogene and an attractive therapeutic target in colon cancers. *Mol Cancer Ther.* 2008;7(2):280-5.
96. Fornaro M, Dell'Arciprete R, Stella M, Bucci C, Nutini M, Capri MG, et al. Cloning of the gene encoding Trop-2, a cell-surface glycoprotein expressed by human carcinomas. *Int J Cancer.* 1995;62(5):610-8.
97. Markoff A, Bogdanova N, Uhlig CE, Groppe M, Horst J, Kennerknecht I. A novel TACSTD2 gene mutation in a Turkish family with a gelatinous drop-like corneal dystrophy. *Mol Vis.* 2006;12:1473-6.
98. Miotti S, Canevari S, Ménard S, Mezzanzanica D, Porro G, Pupa SM, et al. Characterization of human ovarian carcinoma-associated antigens defined by novel monoclonal antibodies with tumor-restricted specificity. *Int J Cancer.* 1987;39(3):297-303.
99. Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2008;99(8):1290-5.
100. Nakashima K, Shimada H, Ochiai T, Kuboshima M, Kuroiwa N, Okazumi S, et al. Serological identification of TROP2 by recombinant cDNA expression

- cloning using sera of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2004;112(6):1029-35.
101. Fong D, Spizzo G, Gostner JM, Gastl G, Moser P, Krammel C, et al. TROP2: a novel prognostic marker in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Mod Pathol*. 2008;21(2):186-91.
102. Alberti S, Miotti S, Stella M, Klein CE, Fornaro M, Menard S, et al. Biochemical characterization of Trop-2, a cell surface molecule expressed by human carcinomas: formal proof that the monoclonal antibodies T16 and MOv-16 recognize Trop-2. *Hybridoma*. 1992;11(5):539-45.
103. Fradet Y, Cordon-Cardo C, Thomson T, Daly ME, Whitmore WF Jr, Lloyd KO, et al. Cell surface antigens of human bladder cancer defined by mouse monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1984;81(1):224-8.
104. He F, Li L, Kim D, Wen B, Deng X, Gutin PH, et al. Adenovirus-mediated expression of a dominant negative Ku70 fragment radiosensitizes human tumor cells under aerobic and hypoxic conditions. *Cancer Res*. 2007;67(2):634-42.
105. Mazzairelli P, Parrella P, Seripa D, Signori E, Perrone G, Rabitti C, et al. DNA end binding activity and Ku70/80 heterodimer expression in human colorectal tumor. *World J Gastroenterol*. 2005;11(42):6694-700.
106. Robinson A. The Ku autoantigen: cast in a new light. *CMAJ*. 1996;154(12):1871-3.
107. Kim SH, Kim D, Han JS, Jeong CS, Chung BS, Kang CD, et al. Ku autoantigen affects the susceptibility to anticancer drugs. *Cancer Res*. 1999;59(16):4012-7.

108. Smith GC, Jackson SP. The DNA-dependent protein kinase. *Genes Dev.* 1999;13(8):916-34.
109. Gu Y, Seidl KJ, Rathbun GA, Zhu C, Manis JP, van der Stoep N, et al. Growth retardation and leaky SCID phenotype of Ku70-deficient mice. *Immunity.* 1997;7(5):653-65.
110. Woo RA, McLure KG, Lees-Miller SP, Rancourt DE, Lee PW. DNA-dependent protein kinase acts upstream of p53 in response to DNA damage. *Nature.* 1998;394(6694):700-4.
111. Liu L, Kwak YT, Bex F, García-Martínez LF, Li XH, Meek K, et al. DNA-dependent protein kinase phosphorylation of IkappaB alpha and IkappaB beta regulates NF-kappaB DNA binding properties. *Mol Cell Biol.* 1998;18(7):4221-34.
112. Monferran S, Paupert J, Dauvillier S, Salles B, Muller C. The membrane form of the DNA repair protein Ku interacts at the cell surface with metalloproteinase 9. *EMBO J.* 2004;23(19):3758-68.
113. Li H, Vogel H, Holcomb VB, Gu Y, Hasty P. Deletion of Ku70, Ku80, or both causes early aging without substantially increased cancer. *Mol Cell Biol.* 2007;27(23):8205-14.
114. Lee JC, Lee CH, Su CL, Huang CW, Liu HS, Lin CN, et al. Justicidin A decreases the level of cytosolic Ku70 leading to apoptosis in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis.* 2005;26(10):1716-30.
115. Rashmi R, Kumar S, Karunagaran D. Ectopic expression of Bcl-XL or Ku70 protects human colon cancer cells (SW480) against curcumin-induced apoptosis while their down-regulation potentiates it. *Carcinogenesis.* 2004;25(10):1867-77.

116. Parrella P, Mazzairelli P, Signori E, Perrone G, Marangi GF, Rabitti C, et al. Expression and heterodimer-binding activity of Ku70 and Ku80 in human non-melanoma skin cancer. *J Clin Pathol*. 2006;59(11):1181-5.
117. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3526-35.
118. Chang YS, Yeh KT, Chang TJ, Chai C, Lu HC, Hsu NC, et al. Fast simultaneous detection of K-RAS mutations in colorectal cancer. *BMC Cancer* [Internet] 2009 Jun 11 [citado 2010 jan 5];9:179 [7p.]. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2702390/pdf/1471-2407-9-179.pdf> DOI: 10.1186/1471-2407-9-179.
119. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer*. 2005;92(1):131-9.
120. Garcia-Rostan G, Zhao H, Camp RL, Pollan M, Herrero A, Pardo J, et al. Ras mutations are associated with aggressive tumor phenotypes and poor prognosis in thyroid cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(17):3226-35.
121. Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2007;13(8):1187-94.
122. Einspahr JG, Martinez ME, Jiang R, Hsu CH, Rashid A, Bhattacharya AK, et al. Associations of Ki-ras proto-oncogene mutation and p53 gene overexpression in sporadic colorectal adenomas with demographic and

clinicopathologic characteristics. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15(8):1443-50.

123. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates JR, Clarke PA. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the multicenter "RASCAL" study. *J Natl Cancer Inst.* 1998;90(9):675-84.

124. Milano G, Etienne-Grimaldi MC, Dahan L, Francoual M, Spano JP, Benchimol D, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) status and K-Ras mutations in colorectal cancer. *Ann Oncol.* 2008;19(12):2033-8.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Principal

Comparar a expressão quantitativa dos genes TACSTD2, Ku70, KRAS mutante e SERIN1 em amostras de tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR.

3.2 Objetivo Secundário

Relacionar a expressão quantitativa dos genes TACSTD2, Ku70, KRAS mutante e SERIN1 com variáveis epidemiológicas, clínicas e anatomopatológicas de pacientes com CCR.

HIPÓTESES

4 HIPÓTESES

4.1 Hipótese Nula (H0)

Não existe diferença entre a quantificação da expressão dos genes TACSTD2, Ku70, KRAS mutante e SERIN1 nos tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR.

4.2 Hipótese Alternativa (H1)

Existe diferença entre a quantificação da expressão dos genes TACSTD2, Ku70, KRAS mutante e SERIN1 nos tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR.

PACIENTES E MÉTODOS

5 PACIENTES E MÉTODOS

5.1 Delineamento do Estudo

Estudo transversal

5.2 População Estudada

Critérios de Inclusão

Pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma colorretal submetidos à ressecção cirúrgica no Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL - PUCRS) entre julho de 2005 e julho de 2009 e cujas amostras de tecido (tecidos tumoral e normal) foram armazenadas consecutivamente no Banco de Tecidos do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) do HSL – PUCRS.

Critérios de Exclusão

Foram excluídos do estudo pacientes com história de PAF, com história de câncer CCHNP, com história de doença inflamatória intestinal (retocolite ulcerativa ou doença de Crohn), com história de CCR sincrônico ou prévio, com história de qualquer neoplasia maligna não-colorretal sincrônica ou prévia, com câncer de reto submetido a radio e/ou quimioterapia neoadjuvantes, com indisponibilidade de dados completos em prontuário médico ou com ausência de expressão do gene normalizador (beta 2 microglobulina) à PCR.

5.3 Amostra Estudada

Inicialmente, foram identificados 64 pacientes cujas amostras teciduais se encontravam armazenadas no Banco de Tumores do IPB – HSL – PUCRS e que preenchiam os critérios de inclusão do estudo. Deste grupo, um paciente foi excluído por apresentar história pessoal de doença inflamatória intestinal (retocolite ulcerativa), nove pacientes foram excluídos devido à história pessoal de CCR prévio ou sincrônico, quatro pacientes foram excluídos em razão de história pessoal de neoplasia maligna não-colorretal prévia ou sincrônica, 11 pacientes foram excluídos por apresentar câncer de reto submetido à radio e/ou quimioterapia neoadjuvantes e dois pacientes foram excluídos em decorrência de falta de dados completos em prontuário médico. Para fins de análise, a amostra do estudo foi composta por 37 pacientes.

5.4 Metodologia

Coleta das Amostras Teciduais

Durante a cirurgia, imediatamente após a ressecção do espécime cirúrgico, o mesmo era acondicionado a fresco no interior de um saco plástico e prontamente conduzido ao Serviço de Anatomia Patológica do HSL – PUCRS para coleta das amostras teciduais. As amostras teciduais consistem em fragmentos de 1 cm² obtidas do centro da superfície tumoral e da margem cirúrgica proximal dos espécimes cirúrgicos. As amostras teciduais de cada paciente foram armazenadas, separadamente, em tubos plásticos, imersas em 500 µL de *RNAholder*®

(BioAgency), solução estabilizadora que permite a conservação de RNA de tecidos a fresco por até uma semana e a -20°C ou menos por período indefinido, eliminando a necessidade de congelação imediata. Todas as amostras de tecido tumoral e normal foram submetidas à microscopia pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) para certificação respectivamente da presença e ausência de tecido tumoral.

Exame Anatomopatológico

O estudo anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos, bem a como a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas amostras de tecido tumoral e normal foram realizados através de microscopia pela técnica de HE por um médico patologista do HSL – PUCRS.

Armazenamento das Amostras

Os tubos plásticos contendo as amostras foram conservados em uma geladeira comum durante um dia; após, armazenados indefinidamente a -196°C em tanque de nitrogênio líquido no Banco de Tecidos do IPB – HSL – PUCRS.

Transporte das Amostras

O transporte das amostras desde o IPB – HSL - PUCRS até o Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) da UFRGS foi realizado a – 196°C, no interior de criotubos imersos em um recipiente térmico contendo nitrogênio líquido.

Extração de RNA

A extração do RNA foi realizada com o reagente Trizol (*Trizol Reagent* 100 mL®, Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. Aproximadamente 100 mg de cada amostra de tecido congelado foi colocado em um tubo plástico de 2 mL, ao qual foi adicionado 1 mL do reagente Trizol para subsequente homogeneização (Omnimix) durante 1 minuto. Após, as amostras foram incubadas em temperatura ambiente por 5 minutos, acrescidas de 0,2 mL de clorofórmio, agitadas em vórtex (*Daiger Vortex – Genie 2®*, A. Daigger & CO., Inc.) por 15 segundos, incubadas novamente à temperatura ambiente durante três minutos e centrifugadas a 12.000 g e à 4°C por 15 minutos (*Centrifuge 5402®*, Eppendorf). A seguir, foi pipetada a fase aquosa de cada amostra para novos tubos plásticos de 2 mL, ao quais foram adicionados 1 mL de isopropanol. Na sequência, as amostras foram incubadas em refrigerador a - 20 °C (*F17 Stock Freezer®*, Prosdócimo) para *overnight*.

No dia seguinte, cada amostra foi misturada por inversão, centrifugada a 12.000 g e à 4 °C por 15 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado, contendo o RNA, lavado com 1 mL de etanol 75% gelado. Cada amostra foi então centrifugada a 8.000 g e à 4°C por 10 minutos.

Novamente o sobrenadante de cada amostra foi desprezado, e o precipitado deixado para secar durante 10 minutos em temperatura ambiente. A seguir, de acordo com o volume do precipitado, foi adicionado de 10 a 30 μL de água ultra pura tratada com DEPC (dietilpirocarbonato). As amostras foram então incubadas a 60°C durante 10 minutos, colocadas por 1 minuto no gelo para quantificação do RNA; finalmente, estocadas a – 80°C (refrigerador Sanyo) para posterior síntese do cDNA.

Quantificação do RNA

Para a quantificação, uma alíquota de 1 μL da solução de RNA de cada amostra foi diluída em 499 μL de água com DEPC e lida em duplicata em um espectrofotômetro para ácidos nucleicos (*Gene Quant*®, Pharmacia Biotech), nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm. A pureza do RNA foi considerada satisfatória quando a razão das absorvâncias a 260 e 280 nm foi superior a 1,6. Considerando que uma unidade de absorvância a 260 nm corresponde a 40 μg de RNA por mL de solução, a concentração de RNA na solução original foi calculada pela fórmula:

$$[\text{RNA}] = A_{260} \times D \times 40 \mu\text{g/mL}$$

Onde: **A**= absorvância e **D**= diluição da alíquota usada para a quantificação.

PCR a partir da Transcrição Reversa (RT-PCR)

Síntese de DNA Complementar (cDNA)

A partir do RNA total extraído, a expressão do mRNA específico para os fatores em estudo foi avaliada, indiretamente, pela técnica de PCR a partir de transcrição reversa (RT), ou simplesmente, RT-PCR. A síntese do cDNA foi feita a partir de 2 µg do RNA total, utilizando oligonucleotídeo (OligodT) complementar à cauda poli-A característica do mRNA, produzindo um cDNA mais puro, exclusivamente a partir do mRNA. Considerando que a fração do mRNA corresponde a aproximadamente 2 a 3% do RNA total, estima-se que 2 µg de RNA total originam 40 ng de cDNA.

Cada amostra de RNA foi inicialmente desnaturada a 65°C por 5 min (*PTC-100*®, MJ Research, Inc.) juntamente com o 1 µL de dNTPmix (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen) e 1 µL de OligodT (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen). Em seguida, a cada amostra foi adicionado 2 µL de 10XPCRBuffer (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen), 4 µL de 25mM MgCl₂ (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen), 2 µL de 0,1M DTT (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen) e 1 µL de Rnase OUT(*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen). As amostras foram então incubadas por 2 minutos a 42°C (*PTC-100*®, MJ Research, Inc.). Na sequência foi adicionado 1 µL da enzima transcriptase reversa SuperscriptII RT (*SuperScript*® *First-Strand*®, Invitrogen) a cada amostra, as quais foram imediatamente incubadas (*PTC-100*®, MJ Research, Inc.) por 50 minutos à 42°C. Após nova desnaturação a 70°C por 15 minutos, cada amostra foi acrescida de 1 µL da enzima Rnase H de *E. coli* (*SuperScript*® *First-Strand*, Invitrogen) e incubada (*PTC-100*®, MJ Research, Inc.) à 37°C por 20 minutos para destruir o RNA não transcrito. A reação de síntese do

cDNA totalizou um volume final de 23 µL de cada amostra, as quais foram armazenadas a - 20°C (*F17 Stock Freezer*®, Prosdóscimo) até a amplificação por PCR.

RT-PCR: Quantificação em Tempo Real

Trata-se de uma técnica bastante sensível que utiliza um sistema de detecção contínua da cinética da reação de RT-PCR por fluorescência (figura 1). Entre as variações da técnica disponíveis, optamos pela utilização do corante fluorescente *Sybr Green I*. Assim sendo, foi adicionado à mistura para reação de RT-PCR o corante fluorescente *Sybr Green I (Platinum SyberGreen qPCR Supermix UDG 100 reações*®, Invitrogen) que se liga à fita dupla de DNA com um aumento de 800 a 1000 vezes na fluorescência. Como o corante liga-se a qualquer fita dupla de DNA, foram realizadas curvas de desnaturação (*melting-Tm*), ou seja, curvas de fluorescência em função da temperatura. Com isso se consegue a especificidade do produto amplificado, uma vez que a curva de *melting* (*Tm*) é fortemente dependente da composição dos nucleotídeos.

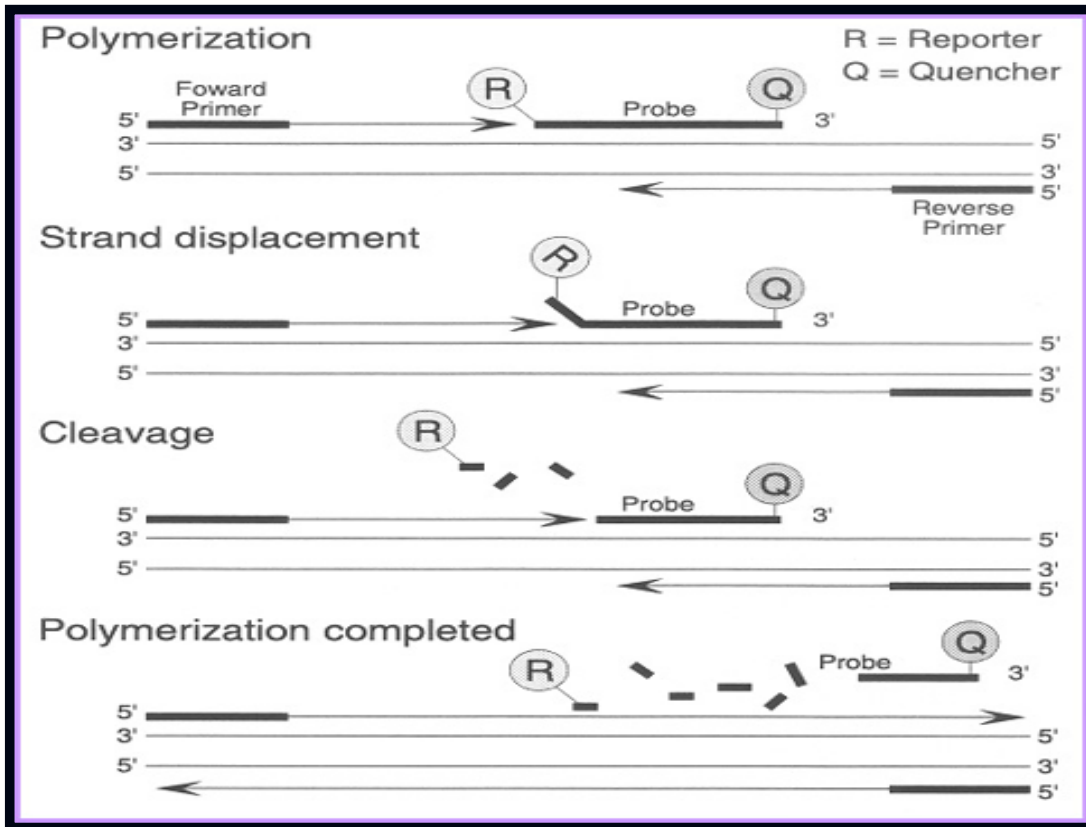


Figura 1: Representação das etapas da PCR em tempo real

Curva de Padronização

Para cada gene em estudo foi realizada uma curva de padronização (figura 2), através da qual foram calculados os valores das amostras. A curva de padronização foi obtida através de reações de RT-PCR que foram feitas a partir de diluições seriadas de um pool de cDNA proveniente de tecidos normais (de 4 ng a 0,008 ng). Todas as amostras foram diluídas na proporção de 1:10.

O momento quando ocorre o aumento exponencial da fluorescência é definido como o C_T , que é inversamente proporcional ao logaritmo da quantidade de cDNA (ng). Portanto, a curva de padronização é gerada analisando os valores de C_T , num

intervalo de 95% de confiança, contra a intensidade da fluorescência do *Sybr green I*, correspondendo ao logaritmo das ng de cDNA.

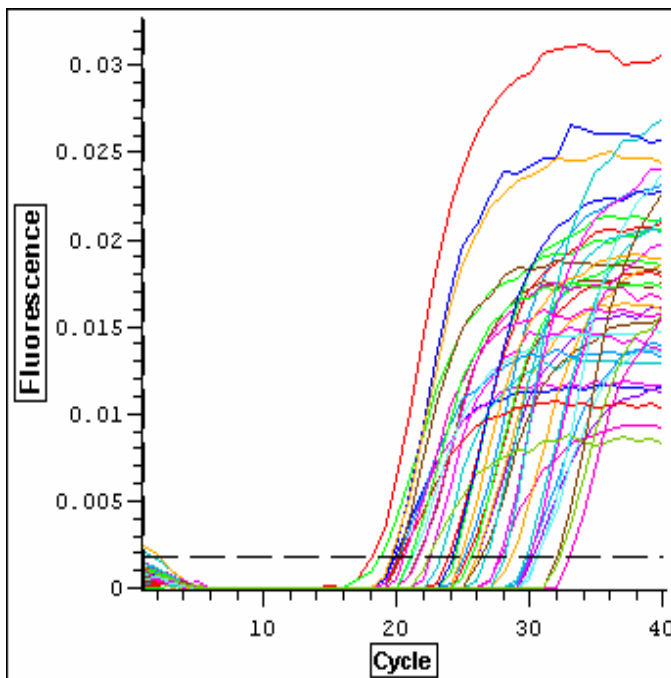


Figura 2: Representação da amplificação do gene β_2m pela PCR em tempo real

Curva de Normalização

Para se evitar variação entre as amostras, uma vez que as mesmas foram obtidas de diferentes indivíduos, foi amplificado – simultaneamente ao gene de interesse – um gene normalizador. O gene normalizador, também chamado constitutivo, é um gene expresso em níveis constantes em diferentes tecidos de um organismo, em todos os estágios do desenvolvimento e sem sofrer alteração por tratamentos experimentais. Neste trabalho, foi utilizado como gene constitutivo a β_2 -microglobulina (β_2m). A β_2m foi amplificada da mesma forma que os genes de interesse (curva padrão entre 4 ng e 0,008 de cDNA)(figura 3). Com o intuito de

minimizar as variações de pipetagem, foi amplificado o gene normalizador em cada reação de amplificação do gene de interesse.

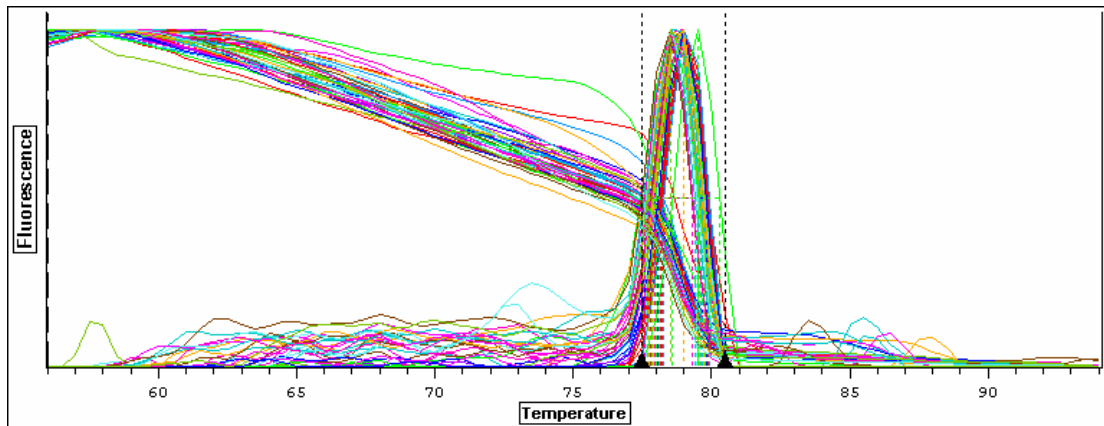


Figura 3: Representação da curva de *melting* do gene $\beta 2m$ pela PCR em tempo real. O pico em 79°C é específico para o gene.

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas no *DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR System*® (Bio-Rad)(figura 4). O volume final das RT-PCR em tempo real foi de 25 μL por reação, contendo 2 μL de cDNA diluídos 10X, 0,1 μM de *primer sense* e *antisense*, 12,5 μL de *PlatinunSybrGreen qPCR SuperMix-UDG*® (Invitrogen) e água ultrapura q.s.p.



Figura 4: Aparelho empregado para execução da PCR em tempo real

As condições das reações foram: 94 ° (2 minutos), 94 ° (50 segundos), X° (45 segundos), 72° (45 segundos), 45 ciclos com extensão final de 2 minutos à 72° e curva de *melting* de 56° à 96° (0,5° a cada 10 segundos). Os *primers* usados e as suas temperaturas de anelamento (X°C) encontram-se abaixo (quadro 2).

Gene	Primer Sense	Primer Antisense	X°C
β₂m (167pb)	CTATCCAGCGTACTCCAAAG	ACAAGTCTGAATGCTCCACT	57
TACSTD2	TGACCTCCAAGTGTCTGCTG	GTCGTAGAGGCCATCGTTGT	57
Ku70	CCACAGGAAGAAGAGTTGGA	CTGCTCTGGAGTTGCCATGA	57
KRAS mutante	CTCACTGCAACCTCCATCTC	GCATCTGGTAGGCACTCAAT	57
SERIN1	TGATGGATCACTGGAGGATG	AGCATGAAGTGAAAGAAGGA	54

Quadro 2: Sequência de pares de base dos *primers* sense e *antisense* dos genes

5.5 Estatística

Os dados referentes aos pacientes pesquisados foram organizados sob a forma de um banco de dados no programa *Microsoft Excel*® (Microsoft), sendo posteriormente exportados para análise estatística no *SPSS*® versão 15.0.

Análise Descritiva

As variáveis categóricas foram descritas através de frequências absoluta e relativa. As variáveis quantitativas com distribuição simétrica foram descritas através da média e do desvio padrão. As variáveis quantitativas com distribuição assimétrica foram descritas através da mediana e intervalo interquartil.

Testes Estatísticos

Para comparação de variáveis assimétricas quantitativas de amostras pareadas, foi utilizado o teste de Wilcoxon. Para comparação de variáveis assimétricas quantitativas e categóricas, foi empregado o teste de Mann-Whitney. Para comparação de variáveis assimétricas quantitativas e categóricas com três ou mais grupos, foi usado o teste de Kruskal-Wallis. Para identificar diferença entre grupos na comparação de uma variável assimétrica quantitativa e uma variável categórica com mais de dois grupos, foi aplicado o teste *post hoc* de Tukey. Para comparação de variáveis quantitativas assimétricas, foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de *p* foi igual ou inferior a 0,05.

5.6 Ética

Este estudo utilizou amostras teciduais coletadas de pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico de CCR no HSL-PUCRS. Estas amostras encontravam-se armazenadas no Banco de Tumores do IPB-HSL-PUCRS. Todos os pacientes cujas amostras compõem este Banco de Tumores consentiram com a coleta e o armazenamento das mesmas, conforme documento anexo I (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HSL-PUCRS.

Antes de sua execução, este estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa e Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (projeto nº 07-626).

Esta pesquisa obedeceu à recomendação das Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde) nos itens III.3.g, III.3.t, IV.1.a, IV.1.b, IV.2.b, IV.2.c E IV.2.d, das Diretrizes para Análise Ética e Tramitação dos Projetos de Pesquisa da Área Temática Especial de Genética Humana (Resolução 340 do Conselho nacional de Saúde) nos itens III.6, III.7, III.11, III.12 e III.15, da *International Ethical Guidelines for Biomedical Research Involving Human Subjects* (Council for International Organizations of Medical Sciences 2002) nos itens 4, 8 e 18, e dos Projetos com Uso ou Armazenamento de Materiais Biológicos (Resolução 347/05 do Conselho Nacional de Saúde) nos itens 1, 2 e 6.

ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

6 ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

THE COMPARISON OF THE GENE EXPRESSION OF MUTANT KRAS, KU70, TACSTD2 AND SERIN1 IN THE TUMORAL AND NORMAL TISSUES OF PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER THROUGH THE TECHNIQUE OF PCR IN REAL TIME

Tiago L. Ghezzi*, Ilma S. Brum, M.D., Ph.D**, Vanderlei Biolchi, M.D.**, Bernardo Garicochea, M.D., Ph.D,***, Lúcio S. Fillmann, M.D. Ph.D,****, Oly C. Corleta, M.D., Ph.D*

* Postgraduate Program in Medicine: Surgical Sciences, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.** Laboratory of Endocrine and Tumoral Molecular Biology, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. *** Institute of Biomedical Research of Sao Lucas Hospital of Pontificia Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil. **** Colorectal Surgery Division of Sao Lucas Hospital of Pontificia Catholic University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil.

Address for correspondence: Tiago Leal Ghezzi. Rua Ramiro Barcelos 910 / 601, 90035-001, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telephones: +55-21-51 97256265 / +55-21-51 33118915 / Fax: +55-21-51 33118151

E-mail: tlghezzi@terra.com.br

Total word count of article: 3110 words

Total word count of summary: 248 words

Financed by: The Fund of Incentive for Research and Events, Hospital de Clinicas, Porto Alegre, RS, Brazil

ABSTRACT

INTRODUCTION: Knowledge of the molecular pathways and of the specific alterations responsible for the unfavorable progression of patients with CCR appears essential for the development of more effective therapies. **PURPOSE:** To compare the quantitative expression of the genes TACSTD2, mutant KRAS, Ku70 and SERIN1 in samples of normal and tumoral tissues of patients with CCR and to relate their expression to clinicopathologic characteristics. **METHODS:** 37 patients with CCR were studied. The patients had been operated on between July 2005 and July 2009, and their frozen samples of tumoral and normal tissues had been stored in a tissue bank. The expression of the genes TACSTD2, mutant KRAS, Ku70 and SERIN1 was quantified through the technique of real time polymerase chain reaction. **RESULTS:** The mutant KRAS expression was higher in the tumoral tissue than in the normal tissue ($p = 0,024$). Although not significant, the tumoral expression of the genes Ku70, TACSTD2 and SERIN1 was respectively lower, equal to, and higher than in the normal tissue. Statistically significant association was also observed between age and mutant KRAS expression in normal tissue and between poorly-differentiated tumors and Ku70 expression in normal tissue. No other statistically significant associations were observed. **CONCLUSIONS:** Tumoral tissues express mutant KRAS at higher levels than normal tissues in the casuistic of 37 patients with CCR studied through the technique of PCR real time.

KEYWORDS: Colorectal Neoplasms/epidemiology; Gene Expression; Neoplasm Staging; Prognosis; Polymerase Chain Reaction; Intestine, Large/pathology; Genes, Neoplasm; Molecular Biology; RNA; DNA; Tumor Markers, Biological; Cross-Sectional Studies

INTRODUCTION

Every year, more than one million people worldwide develop colorectal cancer (CCR)⁽¹⁾. Seventy five per cent of CCRs are sporadic, without links to family history, genetic syndrome or inflammatory bowel disease^(2,3). There are limitations to the current diagnostic procedures available, to stage the extent of the primary tumor, as well as to detect lymph node and liver metastasis⁽⁴⁾. Historically the staging systems of CCR were based exclusively on morphological criteria, whether through image or pathology⁽⁵⁾. However, 20 to 40 per cent of patients with negative lymph node will die of CCR recurrence⁽⁶⁾.

The carcinogenesis is a process composed of multiple steps and requires the accumulation of genetic alterations, inherited or acquired⁽⁷⁾. Two major pathways of colorectal carcinogenesis were identified: chromosomal instability and genetic mutation⁽⁸⁾. With the recent progress in molecular biology, the research of prognostic factors extended to proteins and genes involved in carcinogenesis⁽⁹⁾. Molecular research has shown that the natural histories of CCRs are not identical⁽¹⁰⁾. The knowledge of the molecular pathways and the specific alterations responsible for the unfavorable progression of patients with CCR appear essential for the development of more selective and effective therapies⁽¹¹⁾. As a result, the necessity has arisen to identify the markers of the biological behavior with increased accuracy to predict the prognosis and to select candidates for specific therapies⁽¹⁰⁾.

The tissue banks constitute a rich source of biological material for cancer research, primarily for the study of carcinogenesis and tumoral prognosis⁽¹²⁾. The polymerase chain reaction (PCR) is a molecular biology technique that enables the *in vitro* synthesis of DNA fragments. Real time PCR allowed the real time quantification

of the expression of the specific gene of interest⁽¹³⁾. In recent years, many genes related to the prognosis of patients with CCR have been studied. Among them, four genes stand out: TACSTD2 (gene involved in cell signal transduction)⁽¹⁴⁾, KRAS (gene involved in the control of cell growth and proliferation)^(11,15), Ku70 (gene that repairs broken DNA)^(16,17) and SERIN1 (not yet studied)⁽¹⁸⁾. The aims of this study are to compare the quantitative expression of these genes in samples of normal and tumoral tissues of patients with CCR and to relate their expression to clinicopathologic characteristics.

PATIENTS AND METHODS

This is a cross-sectional study which enrolled patients with CCR who had been operated on by the Division of Colorectal Surgery of Hospital São Lucas of Pontificia Catholic University of Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS) between July 2005 and July 2009 and whose tissue samples (tumoral and normal) had been stored in the Tissue Bank of the Institute of Biomedical Research (IPB) at the same institution. All patients enrolled signed a informed consent form for the collection, storage and studying of their samples. The following patients were excluded: patients with history of Familial Adenomatous Polyposis (FAP), Hereditary Nonpolyposis CCR HNPCC), inflammatory bowel disease, synchronic or previous CCRs, and any other synchronic or previous malignant neoplasia, rectal cancer submitted to neoadjuvant radiochemotherapy, patients with incomplete data and/or with no expression of the normalizer gene (β_2 -microglobulin) following the PCR. The sample for the study was composed of 37 patients.

Collection and Storage of Samples

During the surgery, immediately after the resection of the surgical specimen, samples of 1 cm² were collected from the center of the tumor and the proximal surgical margin. The tubes containing the samples were conserved in liquid nitrogen, at - 321°F in the Tissue Bank of IPB-HSL-PUCRS and subsequently transported to the Laboratory of Endocrine and Tumoral Molecular Biology (LaBiMET), UFRGS.

Histopathology Examination

The histopathology examination of the surgical specimen, as well as the confirmed presence or absence of tumoral tissue in the tumoral and normal samples were carried out through microscopy with hematoxylin and eosin (HE) staining by a pathologist of HSL-PUCRS.

RNA Extraction and cDNA Synthesis

The RNA extraction were carried out with Trizol (*Trizol Reagent 100 mL*®, Invitrogen), according to the manufacturer's protocol, from a sample of 100 mg of frozen tissue. The quantity and quality of RNA were determined through espectrophotometry (*Gene Quant*®, Pharmacia Biotech), from duplicate aliquots of 1 µL of solution. The synthesis of complementary DNA (cDNA) was carried out from 2 µg of the total RNA through PCR with reverse transcription (RT) with *SuperScript First-Strand Synthesis System*® (Invitrogen).

Quantitative Real Time PCR

The real time RT-PCR reactions were performed with the *DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR System*® (Bio-Rad). The final volume per reaction was 25 µL, containing 2 µL of cDNA diluted 10 times, 0,1 µM of *primer sense and antisense*, 12,5 µL of *PlatinunSybrGreen qPCR Supermix-UDG*® and ultrapure water q.s.p.. The conditions of the reactions were: 201°F (2 minutes), 201°C (50 seconds), X°F (45 seconds), 162°F (45 seconds), followed by 45 cycles with a final extension of 2 minutes at 162°F and melting curve of 133°F to 205°F (increasing by 33°F each 10 seconds). The primers used were TACSTD2 (sense: TGACCTCCAAGTGTCTGCTG / antisense: GTCGTAGAGGCCATCGTTGT), Ku70 (sense: CCACAGGAAGAAGAGTTGGA / antisense: CTGCTCTGGAGTTGCCATGA), mutant KRAS (sense: CTCACTGCAACCTCCATCTC / antisense: GCATCTGGTAGGCACTCAAT), SERIN1 (sense: TGATGGATCACTGGAGGATG / antisense: AGCATGAAGTGAAAGAAGGA). The normalizer gene chosen was β_2 -microglubulin. The annealing temperature was 135°F for all genes, except SERIN1 (129°F).

Statistical Analysis

The *SPSS*® program, version 15,0, was used. .The Wilcoxon test was used for the comparison of quantitative asymmetric data of paired samples. The Mann-Whitney test was used for quantitative and categorical asymmetric data. The Kruskal-Wallis test was used to compare quantitative asymmetric data with categorical data containing three or more groups. Pearson's correlation coefficient was used to

compare quantitative asymmetric data. Statistical significance was considered as p-value less than 0,05.

RESULTS

Epidemiological Characteristics

The mean age of the sample studied was 65,5 years (SD = 12,1). Twenty one patients (56,8%) were male. Thirty four patients (91,9%) were caucasian, one (2,7%) was African-American and two (5,4%) were Asian.

Clinical Characteristics

The preoperative measurement median of the carcinoembryonic antigen (CEA) was 2,5ng/mL (Q1 = 1,0 ng/mL; Q3 = 5,4 ng/mL). The clinical staging of the abdomen showed an absence of liver metastasis in 30 patients (81%), presence of liver metastasis in six patients (16,2%), adenomegaly in two patients (5,4%) and was inconclusive concerning the presence of liver metastasis in one patient (2,7%). The clinical staging (CS) of the chest revealed an absence of lung metastasis in 29 patients (82,8%), presence of lung metastasis in one patient (2,7%) and was inconclusive in five patients (14,2%).

Table 1: Relation between TACSTD2 and mutant KRAS expression and clinical pathological characteristics

In relation to the M stage, 27 patients (75%) were M0 and nine (25%) were M1. Nine patients were classified as CS I, 11 patients (30,6%) as CS II, seven patients (19,4%) as CS III and nine patients (25%) as CS IV (table 1 and 2).

Histopathological Characteristics

Twelve patients (32,4%) had a tumor in the right colon, 18 patients (48,6%) in the left colon and seven patients (18,9%) in the rectum. All surgeries were classified as R0 (no residual tumor) (table 1 and 2).

Regarding the histologic grade, two tumors (5,6%) were grade 3 (poorly-differentiated), 33 tumors (91,7%) grade 2 (moderately -differentiated) and two tumors grade 1 (well-differentiated). Mucus production and vascular invasion were observed in five (13,5%) and seven (18,9%) cases respectively (table 1 and 2).

In relation to Stage T, seven tumors were classified as (18,9%) T1, two tumors (5,4%) as T2, 27 tumors (73%) as T3 and one tumor (2,7%) as T4. The median of lymph nodes dissected from the surgical specimen was 12 (Q1 = 9 / Q3 = 20). With regards to stage N, 20 patients (54,1%) were N0, 13 (35,1%) were N1, and four patients (10,8%) were N2 (table 1 and 2). Two patients (5,4%) had tumor implants in the fat tissue adjacent to the tumor.

Table 2: Relation between Ku70 and SERIN1 expression and clinical pathological characteristics

Molecular Characteristics

The quantification of the gene expression showed that all the genes in question had an asymmetric distribution of values (table 3).

Table 3: Quantification of the gene expression in the normal and the tumoral tissues

Among the genes in question, the only one which showed a statistically significant difference of expression was mutant KRAS ($p = 0,024$), with a higher level expression in the tumoral tissue. The quantification of the gene TACSTD2 was equal in both issues ($p = 1,000$). The genes Ku70 and SERIN1 showed levels of expression which were lower and higher respectively in the tumoral tissue, but without a statistically significant difference (Ku70: $p = 0,970$; SERIN1: $p = 0,603$).

A moderate grade of correlation ($r_s = 0,585$; $p = 0,001$) was observed between age and the level of expression of mutant KRAS in the normal tissue. Although not significant ($p = 0,105$), there was also a moderate relation ($r_s = 0,452$) between age and level of expression of TACSTD2 in normal tissue. The expression of Ku70 in normal tissue was lower in tumors poorly differentiated ($p = 0,030$). There was no association of any of the four genes with regards to gender, race, CEA, lymph node metastasis, liver metastasis, lung metastasis, vascular invasion, mucus production, stage TNM and clinical staging of AJCC.

DISCUSSION

A very common disease worldwide, CCR typically has a higher incidence between the ages of 62 and 69 years, which is evident from our casuistics. The

discrete predominance among men (53% of our cases)^(19,20), attributed to the pattern of dietary behavior of men, was also observed in our study (56,8%).

The preoperative abdominal staging was carried out through computerized tomography (CT) in 19 patients (54,2%), ultrasonography (US) in five patients (14,2%) and of both CT and US in 11 patients (31,4%). The preoperative chest staging was carried out through radiography (x-ray) in 22 patients (62,8%), CT in seven patients (20%) and both x-ray and CT in six patients (17,1%). The diagnostic procedures applied in staging are according to current recommendations⁽²¹⁾, ensuring the reliability of data for comparisons in the context of gene expression. The percentage of patients with liver metastasis (16,4%), with lung metastasis (3,5%), and stage M1 (25%) are similar to the rates observed in the literature. The application of the staging system of AJCC classified 20 patients (54,5%) as being in the early stages (CS I or II), similar to the 54% – 61% reported by other authors^(19,22).

Our casuistics, due to the exclusion of patients with rectal cancer submitted to neoadjuvant radiochemotherapy, reported few rectal tumors (18,9%), in contrast to the 30% indicated in other publications⁽²³⁾. The tumor grade, vascular invasion, depth of tumor invasion, stage T, lymph node metastasis, stage N also reiterated the observations made by other authors. The lymph node harvests obtained from the patients studied (median of 12 lymph nodes) align to the current recommendations⁽²⁴⁾ and allow the study of the lymph node metastasis in the context of gene expression.

It is believed that the variation of the expression rate observed in various publications may be caused by the different forms of storing the samples, the various techniques adopted, the tumoral heterogeneity, the diversity of the patients in the study⁽²⁵⁾. Our study attempts to obtain reliable data through the definition of rigid criteria of patient exclusion^(25,26), the rigorous execution of protocols adopted^(27,28) and

the observation of many criteria concerning quality control: the collection of samples representative of tumor tissue⁽²⁶⁾, the collection of the samples within 10 minutes of the resection, the confirmation of the presence or absence of tumoral tissue through microscopy with HE staining⁽²⁸⁾, the utilization of a RNA stabilization solution, the storage of the samples at - 321°F⁽²⁹⁾, the duplicated quantification of RNA⁽³⁰⁾, the confirmation of the normalizer gene expression⁽³¹⁾ and the setting of the standard curve^(32,33). We believe that due to the small number of patients included in this study, the gene expression showed an asymmetric value distribution, which made it difficult to calculate the magnitude of association of the gene expression between different tissues, as well as to compare this data with clinical pathological characteristics.

Many techniques exist for the evaluation of KRAS mutation⁽³⁴⁾. Although considered the most accurate method, PCR does not reveal a strong correlation between the mutation of the KRAS gene and the protein conformation and the level of protein expression, more studies are necessary to standardize the technique and establish consistent results⁽³⁵⁾. Minamoto, through the technique of non-quantitative PCR, showed that mutation of the KRAS is more common in tumoral tissue (55%) than normal tissue (25%)⁽³⁴⁾. The methods currently available do not simultaneously detect the most frequent mutations of the KRAS gene (mutation of codons 12, 13 and 61)⁽²⁹⁾. Our study compared, among the group of patients with CCR, the quantitative expression of mutant KRAS in tumoral and normal tissues through real time PCR. We confirmed that the mutant KRAS expression in tumoral tissue is higher than in normal tissue and is statistically significant. According to literature, we did not observe association between mutant KRAS expression and clinical pathological characteristics usually considered prognostic factors^(25,26,29,34,35).

The sole citation in literature of the SERIN1 gene derives from the publication of Eschrich, who, through a panel of 45 genes established using the technique of DNA microarray determined that the expression of SERIN1 is associated with unfavorable prognosis in patients with CCR⁽¹⁸⁾. Until now, no data exists in relation to the percentage or the level of quantitative expression of SERIN1 in normal and tumoral tissues in patients with CCR. Although expressed at a higher level in tumoral tissue, our study could not identify a statistically significant difference between tissues. Nor did our study show an association between SERIN1 expression and clinical pathological characteristics.

Studies using real time PCR technique and imunochemistry revealed a higher expression of TACSTD2 among patients with gastric and pancreatic cancer respectively^(37,38). Ohmachi studied normal and tumoral tissues of patients with CCR through the techniques of DNA microarray and imunochemistry. Although the level of expression was higher in DNA microarray, no difference was observed in the imunochemistry expression of TACSTD2 between normal and tumoral tissues⁽¹⁴⁾. According to the imunochemistry study of Ohmachi, our research could not show a difference in the level of expression of TACSTD2 between the tissues. With the exception of age, we could not observe, similar to other authors, association with any other clinical pathological characteristics.

Imunochemistry studies, as well as *westernblot*, demonstrated a higher level of Ku70 expression in tumoral tissue than in normal tissues of patients with CCR. With the exception of pathological stage T revealed by Komuro, we could not notice an association between Ku70 expression and clinical pathological characteristics^(16,17). Our research, in contrast to the findings in other literature, demonstrated, despite the absence of a statistical significance, a lower level of Ku70

expression in normal tissue. We believe, similar to Grabsch⁽³⁹⁾, that this difference may be compensatory to the altered expression of proteins in HR pathway (homologous recombination pathway), once the interrelation between these pathways had been recorded. With the exception of the histological grade, we did not observe, along with other authors, association with other clinical pathological characteristics.

CONCLUSION

We conclude that the tumoral tissues express mutant KRAS at higher levels than normal tissues in the casuistic of 37 patients with CCR studied through the technique of PCR real time. We did not observe differences in the expression of TACSTD2, Ku70 and SERIN1 genes between normal and tumoral tissues.

REFERENCES

1. CANCERmondial [homepage on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; c2005 [cited 2010 Jan 4]. Available at: <http://www-dep.iarc.fr/>
2. Read TE, Caushaj PF. Screening for colorectal neoplasms. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. The ASCRS textbook of colon and rectal surgery. New York (NY): Springer; 2007. p.353–61.
3. Nivatvongs S. Treatment of colorectal adenomas: (including screening, follow-up, and surveillance). In: Fazio VW, Church JM, Delaney CP. Current therapy in colon and rectal surgery. 2nd.ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2005. p.331–42.
4. McCormick JT, Gregorcyk SG. Preoperative evaluation of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2006;15:39–49.
5. Hassan AB, Paraskeva C. Colorectal prognosis: is it all mutation, mutation, mutation? *Gut*. 2005;54:1209-11.
6. Cohen AM, Kelsen D, Saltz L, Minsky BD, Nelson H, Farouk R, et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer. *Curr Probl Surg*. 1997;34:601-76.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
8. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002;137:603-12.
9. Pinho MSL. Estadiamento molecular do câncer colorretal: o futuro se aproxima. *Rev Bras Coloproct*. 2005;25:279-84.
10. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001;54:206-14.

11. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolff CR, Steele RJC. Prognostic significance of K-ras, p53, and APC mutations in colorectal cancer. *Gut*. 2005;54(9):1283-6.
12. Ambrosone CB, Nesline MK, Davis W. Establishing a cancer center data bank and biorepository for multidisciplinary research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1575-7.
13. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29:151-9.
14. Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3057-63.
15. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001;85:692-6.
16. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Suzuki N, et al. Prognostic significance of Ku70 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:995-8.
17. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer*. 2002;95:1199-205.
18. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23:3526-35.

19. CRUZ GMG. Câncer nos cólons. In: Coloproctologia: propedêutica geral. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.835–79.
20. CRUZ GMG. Câncer no reto. In: Coloproctologia: propedêutica geral. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.880–921.
21. Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Citopatologia, Sociedade Brasileira de Patologia, Sociedade Brasileira de Clínica Médica. Diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico e multidisciplinar do câncer colorretal. Brasília: Associação Brasileira de Medicina/Conselho Federal de Medicina; 2001. [12 p.]. [cited 2010 jan 7]. Available at: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/020.pdf
22. González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol*. 2004;27:39-45.
23. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum*. 1998;41:428-33.
24. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124:1016-25.

25. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol.* 2002;13:1438-46.
26. Dieterle CP, Conzelmann M, Linnemann U, Berger MR. Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for K-ras mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:641-50.
27. Huang H, Groth J, Sossey-Alaoui K, Hawthorn L, Beall S, Geradts J. Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4357-64.
28. Kim MY, Yim SH, Kwon MS, Kim TM, Shin SH, Kang HM, et al. Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. *Gastroenterology.* 2006;131:1913-24.
29. Mascaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005;92:131-9.
30. Yeh CS, Wang JY, Wu CH, Chong IW, Chung FY, Wang YH, et al. Molecular detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by using membrane array with a multiple mRNA marker panel. *Int J Oncol.* 2006;28:411-20.

31. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol*. 2005;34:597-601.
32. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, et al. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2005;11:2889-93.
33. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004;15:155-66.
34. Minamoto T, Esumi H, Ochiai A, Belitsky G, Mai M, Sugimura T, et al. Combined analysis of microsatellite instability and K-ras mutation increases detection incidence of normal samples from colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res*. 1997;3:1413-7.
35. Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, et al. Prognostic significance of microsatellite instability and Ki-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology*. 2003;64:259-65.
36. Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol*. 2007;13:1187-94.
37. Napieralski R, Ott K, Kremer M, Specht K, Vogelsang H, Becker K, et al. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2005;11:3025-31.
38. Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2008;99:1290-5.

39. Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, et al. Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1 predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1494-500.

Table 1: Relation between TACSTD2 and mutant KRAS expression and clinical pathological characteristics

	N (%)	TACSTD2 Normal	TACSTD2 Tumoral	Mutant KRAS Normal	Mutant KRAS Tumoral
Site ^(b)					
Right colon	12 (32,4)	6,83 (0,32-23,70)	0,59 (0,16-5,51)	0,47 (0,02-0,63)	0,48 (0,22-1,92)
Left colon	18 (48,6)	0,24 (0,75-2,72)	1,68 (0,34-6,86)	1,19 (0,03-0,94)	0,22 (0,02-2,40)
Rectum	7 (18,9)	9,52 (0,07-15,95)	4,99 (4,21-5,77)	0,09 (0,05-0,18)	0,69 (0,02-8,17)
Histologic grade ^(a)					
G1 ou G2	34 (94,5)	1,52 (0,09-7,86)	1,31 (0,25-6,59)	0,10 (0,03-0,46)	0,38 (0,02-1,82)
G3	2 (5,6)	9,52 (9,52-9,52)	0,59 (0,59-0,59)	0,09 (0,09-0,09)	10,0 (1,90-18,12)
Vascular invasion ^(a)					
Absence	30 (81,1)	1,52 (0,07-9,19)	0,95 (0,41-5,77)	0,09 (0,03-0,46)	0,48 (0,04-1,95)
Presence	7 (18,9)	1,88 (0,10-3,65)	0,04 (0,03-10,00)	0,19 (0,03-1,31)	0,42 (0,01-2,98)
Stage T ^(b)					
1	7 (18,9)	0,08 (0,01-0,39)	0,48 (0,24-1,11)	0,11 (0,03-0,66)	1,94 (0,09-2,84)
2	2 (5,4)	0,63 (0,63-0,63)	1,26 (1,10-2,42)	0,25 (0,02-0,48)	0,20 (0,02-0,38)
3	27 (73)	5,24 (0,09-11,13)	2,47 (0,31-10,92)	0,10 (0,04-0,50)	0,45 (0,05-2,17)
Stage N ^(b)					
0	20 (54,1)	0,23 (0,04-2,18)	0,79 (0,43-3,60)	0,11 (0,03-0,66)	0,45 (0,09-1,96)
1	13 (35,1)	2,42 (0,08-12,07)	4,21 (0,19-14,89)	0,06 (0,01-0,31)	1,32 (0,03-2,44)
2	4 (10,8)	9,52 (3,65-39,19)	0,22 (0,22-0,22)	0,09 (0,04-0,27)	0,01 (0,01-18,13)
Stage M ^(a)					
0	27 (75)	0,51 (0,07-7,17)	2,05 (0,49-6,59)	0,10 (0,03-0,63)	0,43 (0,04-1,95)
1	9 (25)	6,58 (0,96-31,78)	0,34 (0,13-8,46)	0,16 (0,07-0,36)	1,68 (0,01-2,98)
CS of the AJCC ^(b)					
I	9 (25)	0,23 (0,02-0,57)	0,48 (0,10-1,68)	0,11 (0,02-0,57)	1,16 (0,06-2,40)
II	11 (30,6)	3,44 (0,06-6,83)	3,99 (0,79-8,47)	0,36 (0,08-6,45)	0,42 (0,09-0,61)
III	7 (19,4)	5,31 (0,68-14,00)	9,62 (4,60-24,94)	0,05 (0,01-0,26)	0,05 (0,01-3,08)
IV	9 (25)	6,58 (0,96-31,78)	0,34 (0,13-8,46)	0,16 (0,07-0,36)	1,68 (0,01-2,98)

Gene expression presented through median and inter-quartile range (IQR1; IQR3)

(a) Mann-Whitney test (b) Kruskal-Wallis test (c) p < 0,05 (d) One patient excluded

Table 2: Relation between Ku70 and SERIN1 expression and clinical pathological characteristics

	n (%)	Ku70 Normal	Ku70 Tumoral	SERIN1 Normal	SERIN1 Tumoral
Site ^(b)					
Right colon	12 (32,4)	0,75(0,49-2,53)	1,70 (1,06-2,78)	5,87 (0,55-13,40)	1,88 (0,66-3,40)
Left colon	18 (48,6)	1,21 (0,51-2,65)	1,12 (0,74-1,25)	2,28 (0,43-7,12)	2,12 (0,37-9,60)
Rectum	7 (18,9)	1,78 (0,40-2,87)	0,79 (0,31-1,55)	0,46 (0,12-2,20)	1,00 (0,47-3,83)
Histologic grade ^(a)					
	^(d)				
G1 or G2	34 (94,5)	1,24 (0,52-2,87)	1,13 (0,71-1,59)	2,51 (0,46-9,32)	1,45 (0,49-5,87)
G3	2 (5,6)	0,23 (0,13-0,33) *	2,76 (1,19-4,33)	0,27 (0,08-0,45)	1,17 (0,46-1,88)
Vascular invasion ^(a)					
Absence	30 (81,1)	1,50 (0,57-2,89)	1,18 (0,82-1,75)	0,73 (0,39-6,64)	1,37 (0,51-3,92)
Presence	7 (18,9)	0,45 (0,15-1,21)	0,72 (0,22-2,99)	6,91 (2,63-11,10)	4,90 (0,26-8,27)
Stage T ^(b)					
	^(d)				
1	7 (18,9)	1,16 (0,70-1,51)	1,17 (0,93-1,51)	0,53 (0,36-1,78)	1,93 (1,09-4,23)
2	2 (5,4)	1,29 (0,48-2,09)	1,71 (1,21-2,21)	2,75 (0,47-5,03)	15,38 (0,73-30,0)
3	27 (73)	1,21 (0,44-2,88)	1,11 (0,72-1,85)	3,39 (0,48-12,28)	1,45 (0,47-5,26)
Stage N ^(b)					
0	20 (54,1)	1,24 (0,65-3,12)	1,18 (0,91-2,12)	1,01 (0,42-7,60)	2,03 (0,54-5,46)
1	13 (35,1)	0,77 (0,38-2,67)	0,86 (0,34-1,53)	1,27 (0,45-8,92)	1,45 (0,58-6,71)
2	4 (10,8)	0,77 (0,20-2,46)	1,36 (0,66-2,62)	5,22 (0,89-12,55)	0,46 (0,32-3,94)
Stage M ^(a)					
	^(d)				
0	27 (75)	1,23 (0,56-2,88)	1,18 (0,77-1,94)	1,00 (0,40-8,35)	1,69 (0,56-4,96)
1	9 (25)	1,21 (0,24-2,67)	0,92 (0,59-2,26)	3,46 (0,57-10,74)	1,88 (0,46-6,71)
CS of the AJCC ^(b)					
	^(d)				
I	9 (25)	1,16 (0,59-1,80)	1,20 (1,17-1,98)	0,53 (0,44-2,42)	1,93 (0,91-7,04)
II	11 (30,6)	1,37 (0,63-7,31)	1,15 (0,75-2,31)	4,46 (0,33-18,57)	2,13 (0,37-5,87)
III	7 (19,4)	0,77 (0,40-2,87)	0,98 (0,15-1,89)	1,00 (0,30-9,91)	1,37 (0,56-6,74)
IV	9 (25)	1,21 (0,24-2,67)	0,92 (0,59-2,26)	3,46 (0,57-10,74)	1,88 (0,46-6,71)

Gene expression presented through median and inter-quartile range (IQR1; IQR3)

(a) Mann-Whitney test (b) Kruskal-Wallis test (c) $p < 0,05$ (d) One patient excluded

Table 3: Quantification of the gene expression in the normal and the tumoral tissues

Gene	Normal Tissue	Tumoral Tissue	p^(a)
TACSTD2	1,52 (0,08 – 8,53)	0,79 (0,31 – 6,04)	1,000
Mutant KRAS	0,10 (0,03 – 0,48)	0,45 (0,03 – 1,96)	0,024
Ku70	1,21 (0,48 – 2,77)	1,17 (0,74 - 1,80)	0,970
SERIN1	1,27 (0,39 – 7,12)	1,37 (0,47 – 4,96)	0,603

Gene expression presented through median and inter-quartile range (IQR1; IQR3)

^(a) Wilcoxon test

ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

7 ARTIGO ORIGINAL EM PORTUGUÊS

COMPARAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA DO KRAS MUTANTE, KU70, TACSTD2 E SERIN1 EM TECIDOS TUMORAL E NORMAL DE PACIENTES COM CÂNCER COLORRETAL PELA TÉCNICA DE PCR EM TEMPO REAL

Tiago L. Ghezzi*, Ilma S. Brum, M.D., Ph.D**, Vanderlei Biolchi, M.D.**, Bernardo Garicochea, M.D., Ph.D,***, Lúcio S. Fillmann, M.D. Ph.D,****, Oly C. Corleta, M.D., Ph.D*

* Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Cirúrgicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. ** Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. *** Instituto de Pesquisas Biomédicas do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil. **** Serviço de Coloproctologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brasil.

Endereço para correspondência: Tiago Leal Ghezzi. Rua Ramiro Barcelos 910 / 601. Caixa Postal: 90035-001, Porto Alegre, RS, Brasil.

Telefones: +55-21-51 97256265 / + 55-21-51 33118915 / Fax: 55-21-51 33118151

Email: tlghezzi@terra.com.br

Contagem de palavras no artigo: 264 palavras

Contagem de palavras do resumo: 3100 palavras

Financiamento: Fundo de Incentivo a Pesquisas e Eventos, Hospital de Clínicas, Porto Alegre, RS, Brasil

RESUMO

INTRODUÇÃO: O estudo das vias moleculares e das alterações específicas responsáveis pela progressão desfavorável de pacientes com CCR parece essencial para o desenvolvimento de terapias mais efetivas. **OBJETIVO:** Comparar a expressão quantitativa dos genes TACSTD2, Ku70, KRAS mutante e SERIN1 em amostras de tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR e relacionar sua expressão com variáveis clínico-patológicas. **MÉTODOS:** Foram estudados 37 pacientes com CCR submetidos à ressecção cirúrgica entre julho de 2005 e julho de 2009 e cujas amostras congeladas de tecidos tumoral e normal foram armazenadas em um banco de tecidos. Através da RT-PCR foi sintetizado o cDNA a partir do RNA extraído das amostras teciduais. A expressão dos genes TACSTD2, KRAS mutante, Ku70 e SERIN1 foi quantificada pela técnica de PCR em tempo real. **RESULTADOS:** A expressão do KRAS mutante foi maior no tecido tumoral do que no normal ($p = 0,024$). A expressão tumoral dos genes Ku70, TACSTD2 e SERIN1 foi respectivamente menor, igual e maior que o tecido normal, porém sem significância estatística. Associação estatisticamente significativa também foi observada entre idade e expressão de KRAS mutante no tecido normal e tumores pouco diferenciados e expressão de Ku70 no tecido normal. Não foram observadas outras associações estatisticamente significativas. **CONCLUSÕES:** A expressão do KRAS mutante no tecido tumoral é maior do que no tecido normal ($p = 0,024$) na casuística de 37 pacientes com CCR estudados através da técnica de PCR em tempo real. **PALAVRAS CHAVE:** Neoplasias colorretais/epidemiologia; Expressão gênica; Estadiamento de neoplasias; Prognóstico; Reação em cadeia da polimerase; Intestino grosso/patologia; Genes neoplásicos; Biologia molecular; RNA; DNA; Marcadores biológicos de tumor; Estudos transversais.

INTRODUÇÃO

Anualmente mais de um milhão de indivíduos desenvolvem câncer colorretal (CCR) em todo o mundo⁽¹⁾. Setenta e cinco por cento dos CCRs são esporádicos, sem associação com história familiar, síndrome genética ou doença inflamatória intestinal^(2,3). Os exames de imagem atualmente disponíveis apresentam limitações para o estadiamento da extensão do tumor primário, bem como para a detecção de metástases linfonodal e hepática⁽⁴⁾. Historicamente, os sistemas de estadiamento do CCR baseiam-se exclusivamente em critérios morfológicos, sejam de imagem ou anatomopatológico⁽⁵⁾. Mesmo assim, 20 a 40% dos pacientes com estadiamento patológico linfonodal negativo morrem de CCR recorrente⁽⁶⁾.

A carcinogênese é um processo composto por múltiplas etapas e requer o acúmulo de alterações genéticas adquiridas ou herdadas⁽⁷⁾. Duas vias principais da carcinogênese colorretal foram identificadas: instabilidade cromossômica e mutação genética⁽⁸⁾. Com os recentes progressos da biologia molecular, a pesquisa de fatores prognósticos se estendeu para as proteínas e os genes envolvidos na carcinogênese⁽⁹⁾. Estudos moleculares demonstraram que a história natural dos CCRs não é idêntica⁽¹⁰⁾. O estudo das vias moleculares e das alterações específicas responsáveis pela progressão desfavorável de pacientes com CCR parece essencial para o desenvolvimento de terapias mais seletivas e efetivas⁽¹¹⁾. Neste cenário, impõe-se a necessidade de identificação de marcadores de comportamento biológico com maior acurácia para predição do prognóstico e para seleção de candidatos a terapias específicas⁽¹⁰⁾.

Os bancos de tecidos constituem rica fonte de material biológico para pesquisa em cancerologia, principalmente para estudos em carcinogênese e

prognóstico tumoral⁽¹²⁾. A reação em cadeia de polimerase (PCR) é uma técnica de biologia molecular que tornou possível a síntese *in vitro* de fragmentos de DNA. A PCR *real time* permite a quantificação em tempo real da expressão de determinado gene em estudo⁽¹³⁾. Nos últimos anos, diversos genes relacionados ao prognóstico de pacientes com CCR têm sido estudados. Entre eles, destacam-se o TACSTD2 (gene que participa da transdução do sinal celular)⁽¹⁴⁾, o KRAS (gene envolvido no controle do crescimento e proliferação celulares)^(11,15), o Ku70 (gene de reparo do DNA)^(16,17) e o SERIN1 (ainda pouco estudado)⁽¹⁸⁾. Os objetivos deste estudo são comparar a expressão quantitativa destes genes em amostras de tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR e relacionar sua expressão com variáveis clínico-patológicas.

PACIENTES E MÉTODOS

Trata-se de um estudo transversal no qual foram incluídos pacientes com CCR submetidos à ressecção cirúrgica no Serviço de Coloproctologia do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (HSL-PUCRS) entre abril de 2005 e julho de 2009 e cujas amostras teciduais (tecidos tumoral e normal) foram armazenadas no Banco de Tecidos do Instituto de Pesquisas Biomédicas (IPB) desta instituição. Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e informado para coleta, armazenamento e estudo de suas amostras. Foram excluídos pacientes com história de polipose adenomatosa familiar, de CCR hereditário não-polipóide, de doença inflamatória intestinal, de CCR sincrônico ou prévio, de qualquer neoplasia maligna sincrônica ou prévia, com câncer de reto submetido a radioquimioterapia neoadjuvante, com dados

incompletos e/ou com ausência de expressão do gene normalizador (beta 2 microglobulina) à PCR. A amostra do estudo foi composta por 37 pacientes.

Coleta e Armazenamento das Amostras

Durante a cirurgia, imediatamente após a ressecção do espécime, eram coletados amostras de 1 cm² do centro do tumor e da margem cirúrgica proximal. Os tubos com as amostras eram conservados em nitrogênio líquido, a – 196°C, no Banco de Tecidos do IPB–HSL–PUCRS e, posteriormente, transportados ao Laboratório de Biologia Molecular Endócrina e Tumoral (LaBiMET) da UFRGS.

Exame Anatomopatológico

O estudo anatomopatológico dos espécimes cirúrgicos, bem a como a confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral nas amostras de tecido tumoral e normal foram realizados através de microscopia pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) por um médico patologista do HSL – PUCRS.

Extração do RNA e Síntese do cDNA

A extração do RNA foi realizada com Trizol (*Trizol Reagent 100 mL*®, Invitrogen), conforme protocolo do fabricante, a partir de amostra de 100 mg de tecido congelado. A quantidade e a qualidade do RNA foram determinadas através de espectrofotometria (*Gene Quant*®, Pharmacia Biotech) de duplicatas de alíquota de 1 µL da solução. A síntese do DNA complementar (cDNA) foi realizada a partir de

2 µg do RNA total por meio de PCR a partir de transcrição reversa (RT) com *SuperScript First-Strand Synthesis System*® (Invitrogen).

PCR Quantitativo em Tempo Real

As reações de RT-PCR em tempo real foram realizadas no aparelho *DNA Engine Opticon 2 Real-Time PCR System*® (Bio-Rad). O volume final foi de 25 µL por reação, contendo 2 µL de cDNA diluídos 10X, 0,1 µM de *primer sense* e *antisense*, 12,5 µL de *PlatinunSybrGreen qPCR SuperMix-UDG*® (Invitrogen) e água ultrapura q.s.p.. As condições das reações foram: 94°C (2 min), 94°C (50 seg), X°C (45 seg), 72°C (45 seg), 45 ciclos com extensão final de 2 min a 72°C e curva de *meelting* de 56°C à 96°C (0,5°C a cada 10 seg). Os *primers* usados foram TACSTD2 (sense: TGACCTCCAAGTGTCTGCTG /antisense: GTCGTAGAGGCCATCGTTGT), Ku70 (sense: CCACAGGAAGAAGAGTTGGA / antisense: CTGCTCTGGAGTTGCCATGA), KRAS mutante (sense: CTCACTGCAACCTCCATCTC / antisense: GCATCTGGTAGGCACTCAAT), SERIN1 (sense: TGATGGATCACTGGAGGATG / antisense: AGCATGAAGTGAAAGAAGGA). O gene normalizador adotado foi a β₂-microglubulina (sense: CTATCCAGCGTACTCCAAAG / antisense: ACAAGTCTGAATGCTCCACT). A temperatura de anelamento foi de 57° para todos genes, com exceção do SERIN1 (54°C).

Análise Estatística

Foi usado o programa SPSS®, versão 15.0. Para comparação de dados assimétricos quantitativos de amostras pareadas, foi usado o teste de Wilcoxon.

Para variáveis assimétricas quantitativas e categóricas, o teste de Mann-Whitney. Para variáveis assimétricas quantitativas e categóricas com três ou mais grupos, o teste de Kruskal-Wallis. Para variáveis quantitativas assimétricas, o coeficiente de correlação de Spearman. Uma diferença foi considerada estatisticamente significativa quando o valor de p foi inferior a 0,05.

RESULTADOS

Características Epidemiológicas

A idade média da amostra de estudo foi de 65,5 anos (DP = 12,1). Vinte e um pacientes (56,8%) eram homens. Trinta e quatro pacientes (91,9%) eram caucasianos, um (2,7%) era afro-descendente e dois (5,4%) eram orientais.

Características Clínicas

A mediana da dosagem pré-operatória do antígeno carcinoembrionário (CEA) foi de 2,5 ng/mL ($Q_1 = 1,0$ ng/mL; $Q_3 = 5,4$ ng/mL). O estadiamento clínico do abdome demonstrou ausência de metástase hepática em 30 pacientes (81,0%), presença de metástase hepática em seis (16,2%), linfadenomegalia em dois (5,4%) e foi inconclusivo quanto à metástase hepática em um (2,7%).

Tabela 1: Relação da expressão do TACSTD2 e do KRAS mutante com as variáveis clínico-patológicas

O estadiamento clínico do tórax demonstrou ausência de metástase pulmonar em 29 pacientes (82,8%), presença de metástase em um (2,8%) e foi inconclusivo em cinco (14,2%). Em relação ao estadiamento M, 27 pacientes (75%) eram M0 e nove (25%) M1. Nove pacientes (25%) foram classificados como EC I, 11 (30,6%) como EC II, sete (19,4%) como EC III e nove (25%) como EC IV.

Características Anatomopatológicas

Doze pacientes (32,4%) apresentavam tumor no cólon direito, 18 (48,6%) no cólon esquerdo e sete (18,9%) no reto. Todas as cirurgias apresentaram margens de ressecção microscopicamente negativas ao exame anatomopatológico.

Quanto ao grau de diferenciação histológica, dois tumores (5,6%) eram pouco diferenciados, 33 (91,7%) eram moderadamente diferenciados e dois (2,8%) eram bem diferenciados. Produção de muco e invasão vascular foram observadas respectivamente em 5 (13,5%) e 7 (18,9%) casos.

Em relação ao estadiamento T, foram observados sete (18,9%) tumores T1, dois (5,4%) T2, 27 (73%) T3 e um (2,7%) T4. A mediana de linfonodos dissecados dos espécimes cirúrgicos foi 12 (Q1 = 9 / Q3 = 20). Quanto ao estadiamento N, 20 pacientes (54,1%) eram N0, 13 (35,1%) N1 e quatro (10,8%) N2. Dois pacientes (5,4%) tinham implantes tumorais no tecido adiposo adjacente ao tumor.

Tabela 2: Relação da expressão do Ku70 e do SERIN1 com variáveis clínico-patológicas

Características Moleculares

A quantificação da expressão gênica demonstrou que todos os genes de interesse apresentaram distribuição assimétrica de valores (tabela 3)

Tabela 3: Quantificação da expressão gênica nos tecidos normal e tumoral

Dentre os genes de interesse, o único que apresentou diferença estatisticamente significativa de expressão foi o KRAS mutante ($p = 0,024$), com maior nível de expressão no tecido tumoral do que no tecido normal. A quantificação do gene TACS DT2 foi igual em ambos os tecidos ($p = 1,000$). Os genes Ku70 e SERIN1 apresentaram níveis de expressão respectivamente menor e maior no tecido tumoral, porém sem diferença estatisticamente significativa (Ku70: $p = 0,970$; SERIN1: $p = 0,603$)

Foi observado moderado grau de correlação ($r_s = 0,585$; $p = 0,001$) entre idade e nível de expressão do gene KRAS mutante no tecido normal. Embora não significativa ($p = 0,105$), também se identificou relação moderada ($r_s = 0,452$) entre idade e nível de expressão do TACS DT2 no tecido normal. A expressão do gene Ku70 no tecido normal é menor em tumores pouco diferenciados ($p = 0,030$). Não foi observada associação de nenhum dos 4 genes com as variáveis sexo, raça, CEA, metástase linfonodal, metástase hepática, metástase pulmonar, invasão vascular, produção de muco, estadiamento TNM e estágio clínico (EC) da AJCC.

DISCUSSÃO

Doença bastante frequente em todo o mundo, particularmente em nosso meio, o CCR caracteriza-se pelo pico de incidência entre os 62 e 69 anos de idade⁽¹⁹⁾, dado consoante com nossa casuística. A discreta predominância no sexo masculino (53% dos casos)^(19,20), atribuída ao padrão dietético-comportamental dos homens, também foi observada em nosso estudo (56,8%).

O estadiamento abdominal pré-operatório foi realizado através de tomografia computadorizada (TC) em 19 pacientes (54,2%), ultrassonografia (US) em 5 (14,2%) e com associação dois exames em 11 (31,4%). O estadiamento torácico pré-operatório foi realizado com radiografia (Rx) em 22 pacientes (62,8%), TC em sete (20%) e com a associação dos dois exames em 6 (17,1%). Os exames de imagem empregados no estadiamento sistêmico alinham-se às recomendações atuais⁽²¹⁾, assegurando dados confiáveis para comparações no contexto da expressão dos genes de interesse. A porcentagem de pacientes com metástase hepática (16,4%), com metástase pulmonar (3,5%) e com estadiamento sistêmico M1 (25%) assemelha-se às taxas observadas na literatura. A aplicação do sistema de estadiamento da AJCC classificou 20 pacientes (54,5%) como estágio precoce (EC I ou II), semelhante aos 54 a 61% observado por outros autores^(19,22).

Nossa casuística, em razão da exclusão de pacientes com câncer de reto submetidos à radioquimioterapia neoadjuvante apresentou poucos tumores de reto (18,9%) em relação aos 30% descrito em outras publicações⁽²³⁾. As variáveis grau de diferenciação histológica, invasão vascular, profundidade de invasão tumoral, estadiamento T, metástase linfonodal e estadiamento N também reproduziram o observado por outros autores. A amostragem de linfonodos obtida dos pacientes

estudados (mediana de 12 linfonodos) atende às recomendações atuais ⁽¹³⁾ e nos permite o estudo da variável metástase linfonodal no contexto da expressão dos genes de interesse.

Acredita-se que a variação da taxa de expressão do KRAS observada em diversas publicações decorra, possivelmente, das diferentes formas de armazenamento das amostras, da variedade de técnicas adotadas, da heterogeneidade tumoral e da diversidade de pacientes incluídos nas pesquisas⁽²⁴⁾. Em nosso estudo, buscamos a obtenção de dados confiáveis através da adoção de critérios rígidos de exclusão dos pacientes^(25,26), da execução rigorosa dos protocolos adotados e da observação de inúmeros critérios de controle de qualidade: coleta de amostra tumoral representativa⁽²⁶⁾, coleta das amostras em período inferior a 10 minutos, confirmação da presença ou ausência de tecido tumoral das amostras por meio de microscopia com hematoxilina-eosina⁽²⁸⁾, utilização de solução estabilizadora de RNA, armazenamento das amostras em temperatura a -196°C ⁽²⁹⁾, quantificação do RNA em duplicata⁽³⁰⁾, confirmação da expressão do gene normalizador⁽³¹⁾, estabelecimento de curvas de padronização⁽³²⁾ e de normalização⁽³³⁾. Acreditamos que por razão do pequeno número de pacientes incluídos no estudo a expressão dos genes de interesse apresentou distribuição assimétrica de valores, o que dificultou o cálculo da magnitude de associação da expressão gênica entre os diferentes tecidos, bem como a comparação desta com as variáveis clínico-patológicas estudadas.

Muitas são as técnicas existentes para avaliação da mutação do KRAS⁽³⁴⁾. Embora considerado o método de melhor acurácia para tal, a identificação da mutação por PCR não apresenta boa correlação com a conformação das proteínas e o nível de expressão protéica, sendo necessários mais estudos para padronização

da técnica e estabelecimento de resultados reprodutíveis⁽³⁵⁾. Minamoto, através de técnica não quantitativa de PCR, demonstrou que a mutação do KRAS é mais frequente no tecido tumoral (55%) do que no tecido normal (25%)⁽³⁴⁾. Os métodos atualmente disponíveis não detectam, simultaneamente, as mutações mais frequentes do gene KRAS (mutação dos códons 12, 13 e 61)⁽²⁹⁾. Nosso estudo comparou, em pacientes com CCR, a quantificação da expressão gênica do KRAS mutante em tecidos normal e tumoral através da técnica de PCR em tempo real. Confirmamos que a expressão do KRAS mutante no tecido tumoral é maior e estatisticamente significativa que no tecido normal. Em consonância com a literatura, não observamos associação da expressão do KRAS mutante com variáveis clínico-patológicas consideradas fatores prognóstico^(25,26,29,34,35).

Na literatura, a única citação do gene SERIN1 deriva da publicação de Eschrich, que através de um painel de 45 genes estabelecido através da técnica de microarranjo de DNA, determinou que a expressão do SERIN1 associa-se com prognóstico desfavorável⁽¹⁸⁾ em pacientes com CCR. Até o momento, inexistem dados relativos ao percentual ou ao nível quantitativo de expressão do SERIN1 em tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR. Embora expresso em maior quantidade no tecido tumoral, nosso estudo não foi capaz de identificar diferença estatisticamente significativa entre os tecidos. Não observamos, também, associação de sua expressão com nenhuma variável clínico-patológica.

Estudos empregando técnica de PCR em tempo real e imunoistoquímica demonstraram expressão aumentada do TACSTD2 em pacientes respectivamente com adenocarcinoma gástrico e ductal de pâncreas^(37,38). Ohmachi estudou tecidos normal e tumoral de pacientes com CCR através das técnicas de microarranjo de DNA e imunoistoquímica. Embora aumentada no tecido tumoral no microarranjo de

DNA, não foi observada diferença de expressão imunohistoquímica da TACSTD2 entre os tecidos normal e tumoral ⁽¹⁴⁾. Em consonância ao estudo imunohistoquímico de Ohmachi, nossa investigação foi incapaz de identificar diferença no nível de expressão do TACSTD2 entre os tecidos. Com exceção da idade, não observamos, a exemplo de outros autores, associação com nenhuma outra variável clínico-patológica.

Estudos de imunohistoquímica e *westernblot* demonstraram maior expressão do Ku70 no tecido tumoral em relação ao tecido normal de pacientes com CCR. Com exceção do estadiamento patológico T observado por Komuro, não foi observada associação da expressão do Ku70 com outras variáveis clínico-patológicas^(16,17). Nosso estudo, ao contrário do observado na literatura, demonstrou, embora sem significância estatística, menor expressão do Ku70 no tecido normal. Acreditamos, a exemplo de Grabsch⁽³⁹⁾, que esta diferença possa ser compensatória à expressão alterada de proteínas da via HR (*homologous recombination pathway*), uma vez que a interrelação entre as duas vias já foi documentada. Com exceção do grau de diferenciação histológica, não observamos, a exemplo de outros autores, associação com outras variáveis.

CONCLUSÃO

Concluimos que na casuística de 37 pacientes com CCR estudados através da técnica de PCR em tempo real o tecido tumoral expressa o gene KRAS mutante em quantidade maior e estatisticamente significativa que o tecido normal. Não observamos diferença quanto à expressão dos genes TACSDT2, Ku70 e SERIN1 nos tecidos normal e tumoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. CANCERmondial [homepage on the Internet]. Lyon: International Agency for Research on Cancer; c2005 [citado 2010 Jan 4]. Disponível em: <http://www-dep.iarc.fr/>
2. Read TE, Caushaj PF. Screening for colorectal neoplasms. In: Wolff BG, Fleshman JW, Beck DE, Pemberton JH, Wexner SD, editors. The ASCRS textbook of colon and rectal surgery. New York (NY): Springer; 2007. p.353–61.
3. Nivatvongs S. Treatment of colorectal adenomas: (including screening, follow-up, and surveillance). In: Fazio VW, Church JM, Delaney CP. Current therapy in colon and rectal surgery. 2nd.ed. Philadelphia (PA): Elsevier Mosby; 2005. p.331–42.
4. McCormick JT, Gregorczyk SG. Preoperative evaluation of colorectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 2006;15:39–49.
5. Hassan AB, Paraskeva C. Colorectal prognosis: is it all mutation, mutation, mutation? *Gut*. 2005;54:1209-11.
6. Cohen AM, Kelsen D, Saltz L, Minsky BD, Nelson H, Farouk R, et al. Adjuvant therapy for colorectal cancer. *Curr Probl Surg*. 1997;34:601-76.
7. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
8. Calvert PM, Frucht H. The genetics of colorectal cancer. *Ann Intern Med*. 2002;137:603-12.
9. Pinho MSL. Estadiamento molecular do câncer colorretal: o futuro se aproxima. *Rev Bras Coloproct*. 2005;25:279-84.

10. Houlston RS. What we could do now: molecular pathology of colorectal cancer. *Mol Pathol*. 2001;54:206-14.
11. Conlin A, Smith G, Carey FA, Wolff CR, Steele RJC. Prognostic significance K-ras, p53, and APC mutations in colorectal cancer. *Gut*. 2005;54(9):1283-6.
12. Ambrosone CB, Nesline MK, Davis W. Establishing a cancer center data bank and biorepository for multidisciplinary research. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006;15:1575–7.
13. Valasek MA, Repa JJ. The power of real-time PCR. *Adv Physiol Educ*. 2005;29:151-9.
14. Ohmachi T, Tanaka F, Mimori K, Inoue H, Yanaga K, Mori M. Clinical significance of TROP2 expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res*. 2006;12:3057-63.
15. Andreyev HJ, Norman AR, Cunningham D, Oates J, Dix BR, Iacopetta BJ, et al. Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II' study. *Br J Cancer*. 2001;85:692-6.
16. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Suzuki N, et al. Prognostic significance of Ku70 protein expression in patients with advanced colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*. 2005;52:995-8.
17. Komuro Y, Watanabe T, Hosoi Y, Matsumoto Y, Nakagawa K, Tsuno N, et al. The expression pattern of Ku correlates with tumor radiosensitivity and disease free survival in patients with rectal carcinoma. *Cancer*. 2002;95:1199-205.
18. Eschrich S, Yang I, Bloom G, Kwong KY, Boulware D, Cantor A, et al. Molecular staging for survival prediction of colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*. 2005;23:3526-35.

19. CRUZ GMG. Câncer nos cólons. In: Coloproctologia: propedêutica geral. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.835–79.
20. CRUZ GMG. Câncer no reto. In: Coloproctologia: propedêutica geral. Rio de Janeiro: Revinter; 2000. p.880–921.
21. Sociedade Brasileira de Coloproctologia, Sociedade Brasileira de Cancerologia, Colégio Brasileiro de Cirurgiões, Colégio Brasileiro de Cirurgia Digestiva, Sociedade Brasileira de Citopatologia, Sociedade Brasileira de Patologia, Sociedade Brasileira de Clínica Médica. Diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico e multidisciplinar do câncer coloretal. Brasília: Associação Brasileira de Medicina/Conselho Federal de Medicina; 2001. [12 p.]. [citado 2010 jan 7]. Disponível em: http://www.projetodiretrizes.org.br/projeto_diretrizes/020.pdf
22. González-Aguilera JJ, Oliart S, Azcoita MM, Fernández-Peralta AM. Simultaneous mutations in K-ras and TP53 are indicative of poor prognosis in sporadic colorectal cancer. *Am J Clin Oncol.* 2004;27:39-45.
23. Lin KM, Shashidharan M, Ternent CA, Thorson AG, Blatchford GJ, Christensen MA, et al. Colorectal and extracolonic cancer variations in MLH1/MSH2 hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds and the general population. *Dis Colon Rectum.* 1998;41:428-33.
24. Compton CC. Updated protocol for the examination of specimens from patients with carcinomas of the colon and rectum, excluding carcinoid tumors, lymphomas, sarcomas, and tumors of the vermiform appendix: a basis for checklists. Cancer Committee. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:1016-25.
25. Bazan V, Migliavacca M, Zanna I, Tubiolo C, Grassi N, Latteri MA, et al. Specific codon 13 K-ras mutations are predictive of clinical outcome in

colorectal cancer patients, whereas codon 12 K-ras mutations are associated with mucinous histotype. *Ann Oncol.* 2002;13:1438-46.

26. Dieterle CP, Conzelmann M, Linnemann U, Berger MR. Detection of isolated tumor cells by polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism for K-ras mutations in tissue samples of 199 colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10:641-50.
27. Huang H, Groth J, Sossey-Alaoui K, Hawthorn L, Beall S, Geradts J. Aberrant expression of novel and previously described cell membrane markers in human breast cancer cell lines and tumors. *Clin Cancer Res.* 2005;11:4357-64.
28. Kim MY, Yim SH, Kwon MS, Kim TM, Shin SH, Kang HM, et al. Recurrent genomic alterations with impact on survival in colorectal cancer identified by genome-wide array comparative genomic hybridization. *Gastroenterology.* 2006;131:1913-24.
29. Masciaux C, Iannino N, Martin B, Paesmans M, Berghmans T, Dusart M, et al. The role of RAS oncogene in survival of patients with lung cancer: a systematic review of the literature with meta-analysis. *Br J Cancer.* 2005;92:131-9.
30. Yeh CS, Wang JY, Wu CH, Chong IW, Chung FY, Wang YH, et al. Molecular detection of circulating cancer cells in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by using membrane array with a multiple mRNA marker panel. *Int J Oncol.* 2006;28:411-20.
31. Bustin SA, Benes V, Nolan T, Pfaffl MW. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. *J Mol Endocrinol.* 2005;34:597-601.

32. Ogawa K, Utsunomiya T, Mimori K, Tanaka F, Inoue H, Nagahara H, et al. Clinical significance of human kallikrein gene 6 messenger RNA expression in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2005;11:2889-93.
33. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech.* 2004;15:155-66.
34. Minamoto T, Esumi H, Ochiai A, Belitsky G, Mai M, Sugimura T, et al. Combined analysis of microsatellite instability and K-ras mutation increases detection incidence of normal samples from colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res.* 1997;3:1413-7.
35. Wang C, van Rijnsoever M, Grieu F, Bydder S, Elsaleh H, Joseph D, et al. Prognostic significance of microsatellite instability and Ki-ras mutation type in stage II colorectal cancer. *Oncology.* 2003;64:259-65.
36. Krtolica K, Krajnovic M, Usaj-Knezevic S, Babic D, Jovanovic D, Dimitrijevic B. Comethylation of p16 and MGMT genes in colorectal carcinoma: correlation with clinicopathological features and prognostic value. *World J Gastroenterol.* 2007;13:1187-94.
37. Napieralski R, Ott K, Kremer M, Specht K, Vogelsang H, Becker K, et al. Combined GADD45A and thymidine phosphorylase expression levels predict response and survival of neoadjuvant-treated gastric cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2005;11:3025-31.
38. Fong D, Moser P, Krammel C, Gostner JM, Margreiter R, Mitterer M, et al. High expression of TROP2 correlates with poor prognosis in pancreatic cancer. *Br J Cancer.* 2008;99:1290-5.

39. Grabsch H, Dattani M, Barker L, Maughan N, Maude K, Hansen O, et al.
Expression of DNA double-strand break repair proteins ATM and BRCA1
predicts survival in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2006;12:1494-500.

Tabela 1: Relação da expressão do TACSTD2 e do KRAS mutante com as variáveis clínico-patológicas

Variável	N (%)	TACSTD2		KRAS Mutante	
		Normal	Tumor	Normal	Tumor
Local ^(b)					
Cólon direito	12 (32,4)	6,83 (0,32-23,70)	0,59 (0,16-5,51)	0,47 (0,02-0,63)	0,48 (0,22-1,92)
Cólon esquerdo	18 (48,6)	0,24 (0,75-2,72)	1,68 (0,34-6,86)	1,19 (0,03-0,94)	0,22 (0,02-2,40)
Reto	7 (18,9)	9,52 (0,07-15,95)	4,99 (4,21-5,77)	0,09 (0,05-0,18)	0,69 (0,02-8,17)
Grau histológico ^(a)					
	(d)				
G1 ou G2	34 (94,5)	1,52 (0,09-7,86)	1,31 (0,25-6,59)	0,10 (0,03-0,46)	0,38 (0,02-1,82)
G3	2 (5,6)	9,52 (9,52-9,52)	0,59 (0,59-0,59)	0,09 (0,09-0,09)	10,0 (1,90-18,12)
Invasão vascular ^(a)					
Ausente	30 (81,1)	1,52 (0,07-9,19)	0,95 (0,41-5,77)	0,09 (0,03-0,46)	0,48 (0,04-1,95)
Presente	7 (18,9)	1,88 (0,10-3,65)	0,04 (0,03-10,00)	0,19 (0,03-1,31)	0,42 (0,01-2,98)
Estádio T ^(b)					
	(d)				
1	7 (18,9)	0,08 (0,01-0,39)	0,48 (0,24-1,11)	0,11 (0,03-0,66)	1,94 (0,09-2,84)
2	2 (5,4)	0,63 (0,63-0,63)	1,26 (1,10-2,42)	0,25 (0,02-0,48)	0,20 (0,02-0,38)
3	27 (73)	5,24 (0,09-11,13)	2,47 (0,31-10,92)	0,10 (0,04-0,50)	0,45 (0,05-2,17)
Estádio N ^(b)					
0	20 (54,1)	0,23 (0,04-2,18)	0,79 (0,43-3,60)	0,11 (0,03-0,66)	0,45 (0,09-1,96)
1	13 (35,1)	2,42 (0,08-12,07)	4,21 (0,19-14,89)	0,06 (0,01-0,31)	1,32 (0,03-2,44)
2	4 (10,8)	9,52 (3,65-39,19)	0,22 (0,22-0,22)	0,09 (0,04-0,27)	0,01 (0,01-18,13)
Estádio M ^(a)					
	(d)				
0	27 (75)	0,51 (0,07-7,17)	2,05 (0,49-6,59)	0,10 (0,03-0,63)	0,43 (0,04-1,95)
1	9 (25)	6,58 (0,96-31,78)	0,34 (0,13-8,46)	0,16 (0,07-0,36)	1,68 (0,01-2,98)
EC da AJCC ^(b)					
	(d)				
I	9 (25)	0,23 (0,02-0,57)	0,48 (0,10-1,68)	0,11 (0,02-0,57)	1,16 (0,06-2,40)
II	11 (30,6)	3,44 (0,06-6,83)	3,99 (0,79-8,47)	0,36 (0,08-6,45)	0,42 (0,09-0,61)
III	7 (19,4)	5,31 (0,68-14,00)	9,62 (4,60-24,94)	0,05 (0,01-0,26)	0,05 (0,01-3,08)
IV	9 (25)	6,58 (0,96-31,78)	0,34 (0,13-8,46)	0,16 (0,07-0,36)	1,68 (0,01-2,98)

Expressão gênica apresentada através de mediana e intervalos interquartis (Q1; Q3)

^(a) Teste de Mann-Whitney

^(b) Teste de Kruskal-Wallis

^(c) $p < 0,05$

^(d) Um paciente excluído

Tabela 2: Relação da expressão do Ku70 e do SERIN1 com variáveis clínico-patológicas

Variável	N (%)	Ku70	Ku70	SERIN1	SERIN1
		Normal	Tumor	Normal	Tumor
Local do tumor ^(b)					
Cólon direito	12 (32,4)	0,75(0,49-2,53)	1,70 (1,06-2,78)	5,87 (0,55-13,40)	1,88 (0,66-3,40)
Cólon esquerdo	18 (48,6)	1,21 (0,51-2,65)	1,12 (0,74-1,25)	2,28 (0,43-7,12)	2,12 (0,37-9,60)
Reto	7 (18,9)	1,78 (0,40-2,87)	0,79 (0,31-1,55)	0,46 (0,12-2,20)	1,00 (0,47-3,83)
Grau histológico ^(a)					
G1 ou G2	34 (94,5)	1,24 (0,52-2,87)	1,13 (0,71-1,59)	2,51 (0,46-9,32)	1,45 (0,49-5,87)
G3	2 (5,6)	0,23 (0,13-0,33) *	2,76 (1,19-4,33)	0,27 (0,08-0,45)	1,17 (0,46-1,88)
Invasão vascular ^(a)					
Ausente	30 (81,1)	1,50 (0,57-2,89)	1,18 (0,82-1,75)	0,73 (0,39-6,64)	1,37 (0,51-3,92)
Presente	7 (18,9)	0,45 (0,15-1,21)	0,72 (0,22-2,99)	6,91 (2,63-11,10)	4,90 (0,26-8,27)
Estádio T ^(b)					
1	7 (18,9)	1,16 (0,70-1,51)	1,17 (0,93-1,51)	0,53 (0,36-1,78)	1,93 (1,09-4,23)
2	2 (5,4)	1,29 (0,48-2,09)	1,71 (1,21-2,21)	2,75 (0,47-5,03)	15,38 (0,73-30,0)
3	27 (73)	1,21 (0,44-2,88)	1,11 (0,72-1,85)	3,39 (0,48-12,28)	1,45 (0,47-5,26)
Estádio N ^(b)					
0	20 (54,1)	1,24 (0,65-3,12)	1,18 (0,91-2,12)	1,01 (0,42-7,60)	2,03 (0,54-5,46)
1	13 (35,1)	0,77 (0,38-2,67)	0,86 (0,34-1,53)	1,27 (0,45-8,92)	1,45 (0,58-6,71)
2	4 (10,8)	0,77 (0,20-2,46)	1,36 (0,66-2,62)	5,22 (0,89-12,55)	0,46 (0,32-3,94)
Estádio M ^(a)					
0	27 (75)	1,23 (0,56-2,88)	1,18 (0,77-1,94)	1,00 (0,40-8,35)	1,69 (0,56-4,96)
1	9 (25)	1,21 (0,24-2,67)	0,92 (0,59-2,26)	3,46 (0,57-10,74)	1,88 (0,46-6,71)
Estádio AJCC ^(b)					
I	9 (25)	1,16 (0,59-1,80)	1,20 (1,17-1,98)	0,53 (0,44-2,42)	1,93 (0,91-7,04)
II	11 (30,6)	1,37 (0,63-7,31)	1,15 (0,75-2,31)	4,46 (0,33-18,57)	2,13 (0,37-5,87)
III	7 (19,4)	0,77 (0,40-2,87)	0,98 (0,15-1,89)	1,00 (0,30-9,91)	1,37 (0,56-6,74)
IV	9 (25)	1,21 (0,24-2,67)	0,92 (0,59-2,26)	3,46 (0,57-10,74)	1,88 (0,46-6,71)

Expressão gênica apresentada através de mediana e intervalos interquartis Q1 e Q3

^(a) Teste de Mann-Whitney

^(b) Teste de Kruskal-Wallis

^(c) $p < 0,05$

^(d) Um paciente excluído

Tabela 3: Quantificação da expressão gênica nos tecidos normal e tumoral

Gene	Tecido Normal	Tecido Tumoral	p*
TACSTD2	1,52 (0,08 – 8,53)	0,79 (0,31 – 6,04)	1,000
KRAS Mutante	0,10 (0,03 – 0,48)	0,45 (0,03 – 1,96)	0,024
Ku70	1,21 (0,48 – 2,77)	1,17 (0,74 - 1,80)	0,970
SERIN1	1,27 (0,39 – 7,12)	1,37 (0,47 – 4,96)	0,603

Expressão gênica apresentada através de mediana e intervalos interquartis Q1 e Q3

* Teste de Wilcoxon

ANEXO

8 ANEXO – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E INFORMADO DO BANCO DE TECIDOS

OBJETIVO DO ESTUDO

O objetivo deste estudo é coletar e armazenar por tempo indeterminado uma parte de tecido que será retirado durante a cirurgia e um pouco de outros materiais biológicos como sangue e afins para realização de pesquisas futuras. Seu material ficará armazenado no laboratório de Biologia Tumoral da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, por tempo indeterminado, para que no futuro sejam realizadas análises para verificar elementos característicos dos tecidos através de novos projetos de pesquisa, devidamente aprovados pelo Comitê de Ética e Pesquisa desta Instituição.

PROCEDIMENTO

Vamos precisar de sua autorização para armazenar uma parte de seu tecido retirado durante a cirurgia e possivelmente coletar uma amostra de qualquer outro material biológico conforme seu médico achar necessário.

RISCOS E DESCONFORTOS

O procedimento cirúrgico ocorreria independente deste projeto, o que não acarretaria em um risco adicional, estamos apenas solicitando sua permissão para armazenar e utilizar uma parte deste material.

Caso seu médico ache necessário e você permitir, ocorrer coleta de outro material biológico durante ou após o procedimento cirúrgico. Os riscos desta coleta serão avaliados e explicados pelo seu médico antes do procedimento.

BENEFÍCIOS

Você não obterá benefício pessoal através deste projeto, porém os dados das pesquisas futuras realizadas com seu material poderão auxiliar novos estudos.

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

Sua autorização para coleta e armazenamento de seu material para este projeto é voluntária. Você poderá optar por não autorizar a coleta ou desistir a qualquer momento que seu material seja guardado no laboratório. Neste último caso seu material será devidamente destruído conforme sua solicitação. Não há nenhuma forma de compensação financeira (ou outra) por sua participação no projeto. Garantimos que sua autorização ou não para as coletas não influenciará em nada qualquer modificação no tratamento e atenção proposto por seu médico assistente.

Qualquer dúvida quanto a este trabalho, tanto por sua parte, como de qualquer familiar, será prontamente fornecida por um dos membros da equipe envolvido neste projeto.

CONFIDENCIALIDADE

Você tem direito à privacidade e toda informação de identificação colhida para este projeto será confidencial até os limites permitidos por lei. Seu registro médico permanecerá confidencial podendo ser necessário ser consultado anonimamente por autoridades legalmente reconhecidas, ou por indivíduos que trabalham diretamente neste estudo, observando o devido sigilo profissional.

Para qualquer pergunta sobre os direitos como participante deste estudo ou se você tiver perguntas poderá entrar em contato com o pesquisador responsável: Dr. Bernardo Garicochea no telefone (51) 3320.3000, ramal 2177.

CONSENTIMENTO

Este documento foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS, o qual é o responsável por assegurar que os direitos humanos sejam protegidos.

Eu _____ li as informações acima e entendi o conteúdo deste termo e o objetivo da coleta do material, bem como os possíveis riscos e benefícios de minha participação. Eu tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram ouvidas e respondidas. Ao assinar este documento eu dou meu consentimento livre e esclarecido para que seja coletado e armazenado meu material biológico neste estudo. Declaro também que recebi uma cópia do presente Termo de Consentimento.

_____/_____/_____
Nome do Paciente Assinatura do Paciente Data

_____/_____/_____
Nome do Representante Legal Assinatura do Paciente Data

Eu abaixo assinado, expliquei este estudo detalhadamente para o paciente identificado acima (e/ou seu representante legal) e darei uma cópia assinada e datada deste documento para o mesmo.

_____/_____/_____
Nome do Investigador Assinatura do Investigador Data