

FATORES CLÍNICOS, EPIDEMIOLÓGICOS E HISTOPATOLÓGICOS ASSOCIADOS À INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES EM CÂNCER COLORRETAL.

FACTORS CLINICAL, EPIDEMIOLOGICAL AND HISTOPATHOLOGICAL ASSOCIATED WITH MICROSATELLITE INSTABILITY IN COLORECTAL CANCER.

André Ritzmann Torres **MARCO**¹, Antônio **NICARETTA**², Maria Angélica Baron **MAGALHÃES**¹, Jean Alexandre Furtado **FRANCISCO**¹, Sandra **MARTIN**¹, Wilson **MICHAELIS**¹, Antônio Carlos Moreira **AMARANTE**¹, Antônio Lacerda **SANTOS FILHO**¹.

Rev. Méd. Paraná/1401

Marco ART, Nicaretta A, Magalhães MAB, Francisco JAF, Martin S, Michaelis W, Amarante ACM, Santos Filho AL. Fatores Clínicos, Epidemiológicos e Histopatológicos Associados à Instabilidade de Microssatélites em Câncer Colorretal. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2016;74(1):51-55.

RESUMO - Objetivo: Verificar a frequência de instabilidade de microssatélites (IMS) em casos de carcinoma colorretal, bem como seus fatores de risco. Material e Método: Foram analisados históricos de pacientes com CCR, avaliando sexo, idade, presença ou ausência de instabilidade de microssatélites MLH-1 e MSH- 2, positividade e negatividade do marcador p53, reatividade do marcador Ki67, profundidade da lesão, invasão vascular e linfonodal e localização do tumor. Resultados: Obteve-se 10,37% de casos com IMS. Não houve correlação entre IMS e idade, gênero, localização do tumor, invasão linfonodal e vascular, profundidade da lesão, mutação de TP53 e taxa de proliferação por anti Ki67. Conclusão: Nesse estudo a presença de IMS no CCR não apresentou relação com fatores clínicos e epidemiológicos conhecidos para essa neoplasia.

DESCRITORES - Instabilidade, Microssatélites, Câncer colorretal, p53, Ki67, Anatomia-patológica, Biologia molecular.

INTRODUÇÃO

Neoplasias de intestino grosso representam importantes desafios na rotina oncológica.¹

Os adenomas de intestino grosso constituem as neoplasias colorretais mais comuns e apresentam grandes chances de malignização. A transformação maligna dos adenomas, está relacionada ao tamanho da lesão, ao tipo histológico e à intensidade de atipias celulares.²

O carcinoma colorretal (CCR) tem distribuição ampla no mundo, com maior incidência nos EUA e em países da Europa Ocidental. No Brasil, representa a quinta causa de morte por neoplasias, o terceiro câncer mais frequente em mulheres e o segundo em homens.^{3, 4}

O CCR pode ser de origem hereditária ou esporádico, quando acomete indivíduos sem história

familiar da doença, representando a maioria dos casos. Seus principais fatores de risco são hábitos alimentares, como ingestão calórica excessiva, baixo teor de fibras não absorvíveis, alta ingestão de carboidratos refinados e carnes vermelhas.^{1, 5}

Do ponto de vista histológico, 95% dos tumores de intestino grosso são adenocarcinomas, os quais podem ser classificados de acordo com o grau de diferenciação.¹

O prognóstico do câncer colorretal é multifatorial, mas seu principal determinante é a extensão da lesão. Por meio de classificações como de Astler-Coller e TNM, é possível o estadiamento dos tumores, avaliando infiltração, linfonodos acometidos e metástases.⁶

A carcinogênese colorretal pode ocorrer de duas maneiras: por meio da via supressora ou da via mutadora. A via supressora é a evolução de um ade-

Trabalho realizado no Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, PR, Brasil.

1 - Docente do Curso de Medicina da Faculdade Evangélica do Paraná, Curitiba, PR, Brasil.

2 - Médico do Serviço de Cirurgia Geral do Hospital Universitário Evangélico de Curitiba, PR, Brasil

noma para um carcinoma. Inicia-se com uma alteração na regulação da proliferação celular por meio de múltiplas mutações em genes supressores e protooncogenes⁶. Essa via decorre de instabilidade cromossômica como resultado de múltiplas mutações em oncogenes^{2,7,8}.

A via mutadora caracteriza-se por alterações, totais ou parciais, em genes de reparo do DNA. A maioria destas alterações envolvem o hMSH2 (localizado no cromossomo 2p22) e o hMLH1 (no cromossomo 3p21). Pequenas porções de material genético classificam-se como satélites e essas alterações, que modificam a ordem original de 1 a 6 nucleotídeos, são conhecidas como instabilidade de microssatélites (IMS). Se as alterações coincidem com regiões codificadoras de genes como TGFBR2, IGF1R e BAX ocorre aumento na proliferação celular, diminuição da apoptose, ou ambos⁹.

Alterações da via mutadora, também denominada via da instabilidade de microssatélite (IMS), decorrem de lesões em genes de reparo do malpareamento genético. Acomete 10 a 15% dos casos esporádicos e está presente na síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC). Tais modificações podem ocorrer em genes de linhagem germinativa, como hMSH2, hMLH1, MSH6, hPMS1, hPMS2, mas em 90% envolve o hMSH2 e o hMLH1. Um indivíduo herda, portanto, genes deficientes e em alguns epitélios susceptíveis, como o do cólon, associa-se à perda da heterozigose, elevando a taxa mutagênica. Quando as falhas do código genético equivalem a genes mantenedores, culmina com o surgimento do carcinoma^{2,9}.

Devido à baixa incidência de alterações, além de seu alto custo e sua complexidade, a pesquisa de IMS não é realizada em todos os casos de CCR. Porém, é indicada para portadores de CCR com características sugestivas de erros de replicação¹⁰.

IMS correspondem a alterações no número de unidades repetidas em um ou mais microssatélites, quando se faz uma comparação com os mesmos microssatélites existentes em amostras de DNA de um tecido normal do próprio indivíduo, sendo essa instabilidade um tipo de "impressão digital" do DNA tumoral¹¹.

Para diagnosticar a presença de IMS faz-se uma comparação entre as características de microssatélites de células tumorais e de um tecido normal do indivíduo. O DNA dos tecidos é extraído e amplificado por meio de uma reação em cadeia da polimerase (PCR). Posteriormente, utiliza-se a eletroforese para comparar a extensão de um ou mais microssatélites entre os dois tecidos¹¹.

A pesquisa de IMS não é a única forma de avaliar a existência de erros de replicação no DNA tumoral. Outra maneira é por meio da avaliação das proteínas de reparo. Até hoje foram identificadas seis proteínas de reparo (MLH1, MSH2, PMS1, PMS2, MSH6 E MLH3), porém, cerca de 90% das mutações são encontradas apenas nas MLH1 e MSH2. A imunohistoquímica representa método de escolha na detecção de tumores com erros de replicação^{11,12}.

O gene MLH1 (gene human mut-s homologue 1) localiza-se no braço curto do cromossomo 3 (3p21-23), em uma área de significativa importância para genes envolvidos no HNPCC¹³. Ele é de fundamental importância no processo de reparação de erros na duplicação do DNA. É conhecido como um gene de reparo do DNA. Quando há um número elevado de alterações nas sequências de microssatélites em um determinado tecido tumoral, evidencia-se ausência da função normal de reparo do DNA, o que pode ser decorrente de mutações presentes nos genes do reparo, principalmente o MLH1 e o MSH2¹³.

O MSH2 está situado no braço curto do cromossomo 2, na posição 21, frequentemente mutado em casos de HNPCC¹⁴. É um gene codificador de proteína que participa na reparação do erros no DNA e está relacionado a algumas doenças com as síndromes de Muir-Torre, de Turcot e a de Lynch¹⁰.

O gene supressor tumoral p53 situa-se no braço curto do cromossomo 17 (região p13.1), tendo como produto de sua transcrição uma proteína nuclear denominada p53, que atua como um gene supressor tumoral. É conhecida "guardiã do genoma", monitorando a integridade do genoma e impedindo a proliferação de células com DNA mutado. Quando existem injúrias no DNA causadas por fatores físicos ou químicos, por exemplo, ativa-se o gene p53, o que leva a transcrição da proteína p53. Com o acúmulo dessa proteína, ocorre inibição do ciclo mitótico já no início da fase G1 e ativação da transcrição de genes de reparo do DNA, impedindo a propagação do erro genético para as células filhas. Porém, se o reparo não for efetuado, a mesma proteína p53 ativa a apoptose¹⁵. Mutações no p53 estão presentes em cerca de 60% das neoplasias humanas¹⁵.

O ki-67 é uma proteína não histônica, presente em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0. Sua principal aplicação é na avaliação da proliferação celular e de margens cirúrgicas. Esse gene está relacionado à invasão tumoral, o que muitas vezes não é detectada à microscopia óptica, sendo que os índices de piora no prognóstico estão relacionados com o aumento da sua positividade¹⁶. Cabe ressaltar que a positividade do Ki-67 não é exclusiva das neoplasias malignas, mas ela é predominante nesta situação quando comparada com as benignas, sendo considerada um ótimo marcador de transformação maligna¹⁶.

A análise de IMS por imunohistoquímica (IMH) constitui uma nova ferramenta na classificação do CCR. Assim, esse trabalho teve por objetivo verificar a frequência de instabilidade de microssatélites (IMS) em casos de carcinoma colorretal, bem como seus fatores de risco.

METODOLOGIA

Este trabalho foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças e

do Hospital Santa Cruz no período de 2009 a 2014 em Curitiba- Paraná e aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade Evangélica do Paraná. Trata-se de um estudo transversal retrospectivo em que foram avaliados históricos de pacientes diagnosticados com CCR por meio de IMH para pesquisa de IMS anti MLH1 e anti MSH2.

Foram incluídos na pesquisa portadores de CCR em que foi realizado - por meio de imunohistoquímica - a pesquisa de microssatélites e cujo prontuário continha dados relativos a sexo, idade, localização da lesão, tipo histopatológico, acometimento linfonodal, profundidade da lesão e invasão vascular. Foram excluídos os casos cujos dados pesquisados não estejam completos.

A positividade e negatividade dos microssatélites MLH-1 e MSH-2, a positividade e negatividade do marcador biológico p53 e a quantificação da positividade do marcador Ki-67 foi avaliada por IMH no Centro de Patologia de Curitiba.

Foram analisados históricos de 106 pacientes com CCR, avaliando sexo, idade, instabilidade de microssatélites MLH-1 e MSH- 2, positividade do marcador p53, porcentagem de reatividade do marcador Ki67, acometimento de linfonodos e vasos sanguíneos, profundidade e localização do tumor.

Foi realizada análise estatística por meio do software BioStat, para verificação da significância ($P < 0,05$), comparando as variáveis envolvidas com a presença ou não de positividade de microssatélites nas lesões avaliadas.

RESULTADOS

Os dados relativos a gênero, idade, positividade para anti-p53, resposta ao marcador Ki67, acometimento de linfonodos e invasão vascular estão dispostos no quadro 1.

QUADRO 1. DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS DOS DIFERENTES CRITÉRIOS NOS PACIENTES COM E SEM INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES.

Características	com IMS	sem IMS	P
Idade do paciente			0.682
<50 anos- n (%)	3 (33,3)	14 (24,1)	
> ou = 50 anos - n (%)	6 (66,7)	44 (75,9)	
Sexo do paciente			0.803
Masculino - n(%)	6 (54,5)	54 (53,5)	
Feminino - n (%)	5 (45,5)	47 (46,5)	
p53			0.994
positivo- n (%)	7 (63,6)	67 (67,7)	
Negativo - n (%)	4 (36,3)	32 (32,3)	
Ki67			0.727
>ou=50% - n (%)	9 (81,8)	74 (74)	
<50% - n (%)	2 (18,2)	26 (26)	
Linfonodos acometidos			0.382
Presente - n (%)	3 (37,5)	10 (21,7)	
Ausente - n (%)	5 (62,5)	36 (78,3)	

Invasão Vascular	0.262	
Presente - n (%)	1 (12,5)	18 (34,6)
Ausente -n (%)	7 (87,5)	34 (65,4)

Dos 106 casos, foram identificados 11 com IMS (10,37%). Desses, 45% eram do sexo masculino e 55% feminino. Dentre os casos negativos para IMS, 47% eram homens e 53% mulheres. Avaliando a presença de IMS em relação aos gêneros, não foi observada diferença ($p=0,803$).

Comparando a positividade de IMS em relação à idade, não foi observada diferença entre os grupos com mais ou menos de 50 anos ($p=0,682$).

Não foi observada diferença entre os grupos quanto à distribuição dos casos positivos e negativos para anti-p53, ($p=0,994$), bem como em relação à resposta ao marcador Ki67 ($p=0,727$).

Não foi observada diferença entre os grupos em relação ao acometimento de linfonodos ($p=0,382$) e invasão vascular ($p=0,262$).

Em relação à distribuição topográfica das lesões dos pacientes que apresentaram IMS, 50% localizavam-se na região de colón direito, 33% na porção íleo cecal e 17% no colón transverso.

Avaliando o estadiamento por profundidade de invasão pela neoplasia em pacientes com IMS, obteve-se 43% dos tumores classificados como T1 e T2 e 57% em estágio T3 e T4.

DISCUSSÃO

Vários estudos apontam a relação entre melhor prognóstico e positividade de microssatélites e, devido ao pequeno número de publicações na literatura nacional, foi estudada a relação entre presença de IMS com outros fatores epidemiológicos e histopatológicos.

A literatura aponta prevalência da instabilidade de microssatélites em pacientes com câncer colorretal de 10 a 15%¹⁷, o que coincide com os dados do presente estudo, em que foi observada 10,3% de IMS nos pacientes estudados.

A avaliação da faixa etária dos pacientes com e sem IMS no presente trabalho revelou que os mecanismos de carcinogênese não têm relação com a idade. Entretanto, a literatura existente demonstra acometimento maior em indivíduos mais jovens, sugerindo a necessidade de um acompanhamento prévio em casos familiares¹². Tal discrepância em nossos achados poderá estar relacionada ao relativo início recente da realização do teste de IMS em Curitiba.

No presente estudo, não houve diferença entre homens e mulheres quanto à presença de IMS. Portanto, não foi possível apontar o sexo do paciente como um fator de risco nos casos com ou sem IMS. Estudos anteriores obtiveram maior prevalência de casos de IMS em homens^{13, 18}.

A presença IMS em tumores no colón proximal foi

relatada por *Geiersbach e Samowitz* (2011)¹², fato também observado na presente pesquisa, demonstrando 66,7% dos casos em cólon proximal. A literatura existente cita que tumores de cólon proximal apresentam duas vezes mais risco de reincidência o que pode estar relacionado à presença de IMS (*PASCAL et al.*, 2005).

Não foi observada diferença no acometimento de linfonodos entre os grupos com e sem IMS nesta pesquisa. Entretanto, há uma maior tendência de tumores com IMS serem mais agressivos e desencadarem metástases nodal, o que está relacionado a pior prognóstico¹⁹.

A invasão vascular também é fator indicativo de agressividade do tumor. *Krasna et al* (1988)²⁰ observaram invasão vascular em 37,6% dos pacientes com CCR. No presente estudo, observou-se invasão vascular em 34,5% dos pacientes do grupo sem IMS, 34,6% e 12,5% no grupo com IMS. Porém não houve diferença entre os grupos, contrapondo os dados da literatura pesquisada. Essa divergência de valores pode ter ocorrido em função da época em que os trabalhos foram realizados, uma vez que, atualmente, os métodos diagnósticos são mais precisos, facilitando a descoberta precoce do tumor, com menor possibilidade de disseminação vascular.

O estadiamento do câncer colorretal tem como primeira variável a avaliação da profundidade de invasão da lesão. Uma vez identificada a estrutura acometida, é classificada a lesão em T1 (acometimento de submucosa), T2 (acomete mas não ultrapassa a muscular própria), T3 (acomete até a serosa) e T4 (acometimento de tecido adiposo pericôlonico e estruturas adjacentes)².

Augusto et al (2008)⁷, em uma análise de 100 casos, obteve 74% dos tumores em estágio T3 ou T4 e 26% classificados como T1 ou T2. No presente trabalho, no grupo com instabilidade de microssatélites, foram identificados 57,1% dos casos como T3 ou T4 e 42,9% como T1 ou T2. Esta observação sugere que tumores com IMS tendem a apresentar estadiamento mais avançado do que os tumores sem IMS, como já relatado anteriormente.

O câncer colorretal pode ser subdividido de acordo com sua característica histológica em tubulares e mucinosos e outros. Desses, o primeiro é o mais frequente, representando 93,4% dos casos. *Pereira Junior et al* (2005)⁵. *Romã et al* (2006)²¹ correlacionou o tipo histológico com a presença de IMS e obteve resultado de 34% de tumores do tipo mucinoso. Em nossa pesquisa, obteve-se 55,5% de casos de tubulares e 33% de mucinosos, corroborando achados da literatura. A prevalência de tumores tubulares moderadamente e bem diferenciados equivale à encontrada em análise de tumores independente da presença ou ausência de IMS. Desta forma, o achado de valor reduzido no grupo com IMS, associado a maior presença de carcinomas mucinosos, corrobora uma eventual associação do tipo histológico mucinoso com a carcinogênese por via supressora e mutação de genes MMR, dados importantes

que devem ser considerados no momento da escolha da terapia curativa ou paliativa do paciente.

Em adição aos dados da literatura, o presente estudo comparou qual a instabilidade de microssatélite presente em relação ao seu respectivo tipo histológico. O carcinoma mucinoso pouco diferenciado foi o único, dentre os 11 casos com IMS, que apresentou instabilidade de ambos os biomarcadores pesquisados, tanto o MLH-1 quanto o MSH-2. *Fu et al.* (2006)²² relata casos de tumor de célula em anel de sinete, considerado uma variável do carcinoma mucinoso, com instabilidade simultânea de múltiplos microssatélites.

O gene supressor tumoral, no cromossomo 17, codifica proteína denominada também denominada p53 que tem papel importante no ciclo celular. Esta proteína tem o objetivo de impedir a divisão celular em células com o código genético danificado, possibilitando a reparação. A perda deste gene pode se relacionar com o início e com a progressão de um câncer.

Mutações isoladas do gene TP53 já foram relacionadas com pior prognóstico e maior risco de metástase, mas não foram encontradas citações entre a mutação do gene TP53 simultâneas a outras alterações genéticas de instabilidade genômica²³.

Pinho (2000)²⁴ coloca como incidência de positividade do p53 em câncer colorretal valores entre 40 e 70%. Em ambos os grupos foram encontrados valores dentro desta faixa; 67,7% de positividade do p53 nos casos sem IMS e 63,6% nos casos com IMS. No atual trabalho, não houve diferença entre os grupos quanto à positividade. Portanto, não foi possível estabelecer, por meio desta análise, uma relação entre a positividade do p53 e a presença ou ausência de IMS.

A positividade do p53 indica processo de carcinogênese pela via da instabilidade cromossômica, ou via supressora, o que não impede de ocorrer, simultaneamente, a via mutadora, por meio da alteração dos genes de reparo, aqui representados pelo MLH-1 e MSH-2^{25, 26}.

O antígeno utilizado na imunohistoquímica definido pelo anticorpo monoclonal Ki-67 corresponde a uma proteína nuclear. O anticorpo reconhece somente a porção lábil do antígeno, ausente nas células na fase G0 e presentes nas células em proliferação. O ki-67 constitui marcador de proliferação celular e sua hiperexpressão é relacionada a menor sobrevida e pior resposta a radioterapia^{8, 27}. A presente pesquisa buscou relacionar a expressão do Ki-67 com a presença de IMS. Foi identificada alta expressão (maior ou igual a 50%) em 81,8% dos casos com IMS, e de 74% nos casos sem IMS, o que não foi significativo. Porém, pode representar uma tendência de que tumores com IMS apresentem maior proliferação, requerendo atenção especial e busca por medidas terapêuticas mais agressivas.

O presente trabalho buscou estabelecer uma relação entre a presença de IMS em CCR com vários outros fatores. Essas associações são importantes para determinar o perfil das neoplasias, tão frequentes na rotina

médica. Maiores estudos se fazem necessários no sentido de compreender melhor o comportamento dessa neoplasia.

CONCLUSÕES

Não foram encontradas relações entre instabilidade de microssatélites em carcinoma colorretal quanto

a idade e gênero do paciente, localização anatômica do tumor, profundidade, invasão vascular e linfonodal, mutações nos genes MLH1 e MSH2 e positividade para anti-p52 e ki67.

Marco ART, Nicaretta A, Magalhães MAB, Francisco JAF, Martin S, Michaelis W, Amarante ACM, Santos Filho AL. Factors Clinical, Epidemiological and Histopathological Associated with Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. Rev. Méd. Paraná, Curitiba, 2016;74(1):51-55.

ABSTRACT - Objective: The aim of this study was to verify the frequency of microsatellite instability (MSI) in cases of colorectal carcinoma and their risk factors. Material and Method: We analyzed historical CRC patients, evaluating sex, age, instability MLH -1 microsatellite and MSH- 2 , positivity of the p53 marker, percentage of Ki67 marker , presence of lymph nodes metastases , depth of lesion , vascular and lymph nodes invasion and tumor location. Results: There was 10.37 % of cases with IMS. There was no correlation between IMS and age, gender, tumor location , lymph node and vascular invasion, depth of the lesion , TP53 mutation and proliferation rate by anti Ki67. Conclusion: The presence of IMS in CRC is not related with clinical and epidemiological factors known to this neoplasm.

KEYWORDS - Microsatellite-instability, Colorectal cancer, p53, Ki67, Pathology, Molecular biology.

REFERÊNCIAS

1. Brasileiro Filho GB. *Bogliolo Patologia*. 8ED. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1500p.
2. Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Robbins e Coltran: Patologia - bases patológicas das Doenças*. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2005. 1592p.
3. Brasil. Instituto Nacional Do Câncer (2014). Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/colorretal/definicao+>. Acesso em 09/09/14.
4. Oliveira VC, Leite SMO, Gomes KB, Ferreira ACS, Pardini VC. A Importância do Estudo de Instabilidade de Microssatélites na Avaliação do Câncer Colorretal Hereditário Não Polipose (HNPCC). *News Lab*2005, 73: 115-117.
5. Pereira Junior TP, Alves AJC, Nogueira AMMF. Câncer colorretal : análise anatomopatológica de 476 colectomias consecutivas em Belo Horizonte (MG). *J Bras Patol Med Lab* 2005, 41: 175-184.
6. Winawer S, Fletcher R, Rex D, et al. Colorectal cancer screening and surveillance: clinical guidelines and rationale-Update based on new evidence. *Gastroenterology*, v. 124, n. 2, p. 544-60, 2003
7. Martinez CA, Priolli DG, Cardinalli IA, Pereira JA, Portes AV, Margarido NF. Influência da localização do tumor na expressão tecidual da proteína p53 em doentes com câncer colorretal: estudo de 100 casos. *Rev Col Bras Cir* 2008, 35: 235-243
8. Ribeiro U, Alves VA, Souza PMSB, et al. Correlação das proteínas p53 e ki-67 com o prognóstico de pacientes com adenocarcinoma de reto distal. *Rev bras Coloproct*, 2000; 20: 248-256.
9. Casey G, Lindor NM, Papadopoulos N, N.; et al. Conversion Analysis for Mutation Detection in MLH1 and MSH2 in Patients with Colorectal Cancer. *AMA* 2010, 293: 799-809.
10. Frayling IM. Microsatellite instability. *Gut*, v. 45, p. 1-4, 1999.
11. Pinho MSL. Câncer colorretal com instabilidade de microssatélites: uma doença diferente. *Rev bras Coloproct* 2002, 22: 139-144.
12. Geiersbach KB Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, v. 135, n. 10, p. 1269-1277, 2011.
13. Losso GM, Moraes RS, Gentili AC, Messias-Reason IT. Instabilidade de microssatélite - msi nos marcadores (bat26, bat25, d2s123, d5s346, d17s250) no câncer de reto. *ABCD Arq Bras Cir Dig*, v. 25, n. 4, p. 240-244, 2012.
14. Gryfe R, Kim H, Hsieh ETK et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *New Eng J Med* 2000, 342: 69-77.
15. Fett-Conte ACA. A importância do gene p53 na carcinogênese humana. *Rev bras hematol hemoter* 2002, 24: 85-89.
16. Barbosa TV, Rosas MP, Costa AC, Rapoport A. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Ver Bras Otorrinol* 2003, 69: 629-634.
17. Alexander J, Watanabe, T, Wu TT et al. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol* 2001, 158: 527-535.
18. Gómez-Domínguez E, Trapero-Marugán M, Pozo J, et al. The colorectal carcinoma prognosis factors. Significance of diagnosis delay. *Rev Esp Enferm Dig* 2006, 98: 322-325.
19. Durante AP, Bromberg SH, Barreto E, Capellano G, Godoy AC. Importância da invasão neural e linfática no prognóstico do adenocarcinoma colorretal. *Rev assoc Med Bras* 2004, 50: 21-26.
20. Krasna MJ, Flancbaum L, Cody RP, Scheibaum S, Ari G. BEN. Vascular and Neural Invasion in Colorectal Carcinoma. *Cancer* 1988, 61: 1018-1023.
21. Romá AP, González CA, Martínez RJ, Lopez IA. Carcinoma colorrectal con alteración de la vía reparadora . Claves para su identificación y relevancia clínica. *Rev Esp Patol* 2006, 39: 201-208.
22. Fu K, Sano Y, Kato S et al. Primary signet-ring cell carcinoma of the colon at early stage: A case report and a review of the literature. *World J Gastro* 2006, 21: 3446-3449.
23. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e Molecular*. 8 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 332p.
24. Pinho MSL. Proteína P53: Algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão da literatura. *Rev bras Coloproct* 2000, 20: 1-3.
25. Almeida JCR, Pedrosa NDL, Leite JB, et al. Marcadores Tumorais: Revisão de Literatura. *Rev Bras Cancerol* 2007, 53: 305-316.
26. Cutait G, Cotti DC, Pires F.; et al. Genética do câncer colorretal. *Rev Med* 2000, 79: 45-64.
27. Esposito JP Camargo RS, Longatto Filho A, et al. Expressão imuno-histoquímica dos marcadores pcna, Ki67 e p53 em carcinomas epidermóides do trato aerodigestivo superior. *Rev Bras Col Cir* 2000, 27: 327-331.