

Aspectos genéticos do câncer colorretal e seu impacto no manejo da doença

Genetic aspects of colorectal cancer and its impact on disease management

Fernanda Cardoso Parreiras¹, Gustavo Martins Zola Santiago¹, Alexandre Martins da Costa¹, Antônio Lacerda Filho²

DOI: 10.5935/2238-3182.20130034

RESUMO

Diversos estudos buscam agregar métodos de diagnóstico e de terapêutica com o intuito de diminuir a incidência e a morbimortalidade do câncer colorretal (CCR). Novas tecnologias propostas para esse fim decorrem da análise do DNA fecal, terapias voltadas para alvos moleculares específicos e determinação de resposta terapêutica e prognóstico com a análise genética. Este estudo procura revisar essas novas conquistas e apresentá-las para que possam ser usadas de forma prática e objetiva.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais/genética; Neoplasias Colorretais/diagnóstico; Neoplasias Colorretais/terapia; Testes Genéticos.

¹ Acadêmica(o) do Curso de Medicina da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.
² Professor Adjunto do Departamento de Cirurgia – Faculdade de Medicina. Coordenador da Disciplina de Coloproctologia da Faculdade de Medicina da UFMG. Belo Horizonte, MG – Brasil.

ABSTRACT

Several studies seek to enhance diagnosis and treatment of colorectal cancer (CRC) in order to reduce its incidence and mortality. New technologies proposed include the analysis of fecal DNA, therapies aimed at specific molecular targets and determination of therapeutic response and prognosis with genetic analysis. This study aims to review these new achievements and present them so that they can be used in a practical and objective way.

Key words: *Colorectal Neoplasms/genetic; Colorectal Neoplasms/diagnosis; Colorectal Neoplasms/therapy; Genetic Testing.*

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) figura entre as cinco primeiras causas de morte por câncer, excluindo-se os tumores de pele não melanoma.^{1,2} A forma esporádica representa 70% dos casos de câncer colorretal, sendo mais observado após os 50 anos de idade. As lesões devidas ao ácido nucleico (DNA) são geralmente causados pela interação com o ambiente ou pelos efeitos do envelhecimento. O CCR hereditário aparece em indivíduos que herdaram uma alteração em um gene supressor de tumor. Em menos de 10% dos pacientes observa-se predisposição hereditária para o CCR.¹

AS BASES GENÉTICAS DO CÂNCER COLORRETAL

Pode ocorrer espontaneamente mutação em uma célula durante o seu crescimento ou desenvolvimento e essa mutação somática pode resultar em proliferação de células contendo material genético alterado (mutado). A maioria dos genes

Recebido em: 24/03/2010
Aprovado em: 23/03/2011

Instituição:
Faculdade de Medicina da UFMG
Belo Horizonte, MG – Brasil

Autor Correspondente:
Prof. Antônio Lacerda Filho
E-mail: alacerdafilho@gmail.com

mantém sua função, mesmo que um dos alelos seja inativado. Para que haja perda da função gênica e o surgimento de um processo proliferativo, caracterizando neoplasia, é preciso que ambos os alelos sejam inativados.

No caso do CCR esporádico, ambos os alelos devem ser inativados por eventos genéticos fortuitos, como mutações somáticas, deleções ou hipermetilações. São necessárias, em geral, várias décadas para que ambos os alelos dos genes envolvidos com o mecanismo de tumorigênese sejam perdidos, o que pode explicar a frequência de CCR esporádico ser maior em pessoas com idade mais avançada.³

Os genes mutados nos diferentes tumores humanos pertencem a três diferentes classes: oncogenes, genes supressores de tumor e genes de reparo de DNA (*MMR-DNA Mismatch Repair genes*).³

GENES ENVOLVIDOS NO CÂNCER COLORRETAL

Oncogenes

Os protooncogenes são genes que produzem as proteínas que promovem crescimento e proliferação celular. As mutações que neles se verificam produzem ganho de função e podem ser causadas pela mutação em apenas um dos alelos.⁴

Os principais oncogenes envolvidos no CCR são os genes da família RAS composta de três genes – K-RAS (v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog), H-RAS (v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog) e N-RAS (neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog), que codificam pequenas proteínas (21 kDa) que se ligam à guanina trifosfato (GTP). As proteínas RAS, também chamadas de p21, estão localizadas na membrana celular.^{4,5}

Genes supressores de tumor

Os genes de supressão tumoral produzem proteínas que inibem a formação do tumor pela regulação da atividade mitótica, proporcionando controle inibitório do ciclo celular. Ocorre proliferação tumoral quando esses controles inibitórios são desregulados pela mutação. Os principais genes supressores de tumor relacionados ao câncer colorretal são o gene APC e o gene p53.

As mutações iniciais na sequência adenoma-carcinoma acontecem no gene APC. A alteração fenotípica mais precoce é conhecida como “formação de cripta aberrante” e as aberrações genéticas típicas dessas células correspondem à formação de proteínas anormalmente curtas, conhecidas como truncagens do APC ou proteínas truncadas. A maioria das perturbações clinicamente relevantes relacionadas ao gene APC são mutações de truncagem criadas pela transcrição inapropriada de códons de terminação prematura.⁶

As mutações no gene p53 (*tumor protein p53*) localizado no braço curto do cromossomo 17 (17p13) são identificadas em 50% ou mais dos tumores colorretais e estão localizadas preferencialmente entre os éxons 5 e 8 desse gene. Essa mutação gera inativação do gene p53 e isso, por vezes, coincide com a transição de adenoma para carcinoma invasivo nos CCRs.^{4,5} A identificação de mutação no gene p53 tem importância para o prognóstico do CCR, pois em pacientes com tumores ela tem pior prognóstico e sobrevida mais curta.

Em 70% dos casos de CCR observam-se deleções do braço longo do cromossomo 18 (18q21), onde está localizado o gene *deleted in colorectal carcinoma* (DCC). Acredita-se que esse gene codifica uma proteína que atua nas interações célula-célula e célula-matriz, sendo que sua mutação está relacionada ao surgimento dos chamados adenomas avançados.⁷

Genes de reparo

O sistema de reparo de DNA atua durante o seu processo de replicação e é responsável pela substituição, com alta fidelidade, de nucleotídeos que apresentem pareamento incorreto. A inativação desse sistema, portanto, pode levar ao acúmulo errôneo de nucleotídeos pareados e predisposição à carcinogênese.

Mutações nesses genes estão relacionadas à síndrome de CCR hereditário sem polipose (HNPCC), também conhecida como síndrome de Lynch. A formação de tumor requer a inativação do sistema de reparo seguida por outras mutações, como a do gene APC. As mutações nos genes de reparo produzem instabilidade de microssatélites (MSI)^{3,8}, que são sequências repetitivas de DNA que parecem estar aleatoriamente distribuídas ao longo do genoma. A estabilidade dessas sequências é boa medida da integridade do DNA. Os tumores que possuem essa instabilidade são classificados como tumores com erro de replicação (RER+).

Genes modificadores

Nas últimas décadas, houve extraordinário aumento do conhecimento das vias carcinogênicas que envolvem a ciclo-oxigenase e a patogênese do CCR. O ácido acetilsalicílico (AAS) usado cronicamente reduz a incidência de adenomas e de CCR. O principal alvo dos anti-inflamatórios não esteroides, incluindo o AAS, é a enzima ciclo-oxigenase (COX), que está envolvida na produção de prostaglandinas e outros eicosanoides, a partir do ácido aracdônico. São identificadas duas isoformas da proteína COX: a COX-1, que é componente constitutivo das células normais; e COX-2, um gene induzido associado a inflamação e carcinogênese.⁹⁻¹¹

O gene COX-2 apresenta aumento de expressão em aproximadamente 43% dos adenomas e 86% dos carcinomas. O nível de expressão de COX-2 possivelmente influencia a regulação da angiogênese e da apoptose.⁹ O uso de sulindac, um inibidor inespecífico de COX, promove a regressão de pólipos em pacientes com polipose adenomatosa familiar¹², o que também é observado com a utilização de inibidores de COX-2, entretanto, tem sido desaconselhada essa droga para esse fim, devido à sua potencial cardiotoxicidade.

Estudos preliminares mostram que o gene *peroxisome proliferative activated receptor* (PPAR) pode estar envolvido na transdução de sinal mediada pelo gene APC e com a via de COX¹⁰.

A Tabela 1 apresenta um sumário dos genes envolvidos na carcinogênese do CCR, a frequência encontrada dos mesmos e suas principais ações.

Tabela 1 - Oncogenes e Genes supressores de tumor associados ao Câncer Colorretal

Gene	Frequência	Associação
APC	85%	Associado a Polipose Familiar Hereditária e sua inativação é encontrada em 85% dos cânceres colorretais esporádicos.
MLH1, MSH2, MSH6	15-25%	Associado a câncer colorretal hereditário sem polipose HNPCC.
TP53	35-55%	Associado a transição de pólipo para câncer invasivo, enquadrando-se como última chave deste processo.
TGFBR2	25-30%	Mutação presente em 90% dos tumores com instabilidade microssatélite e 15% dos cânceres colorretais com estabilidade microssatélite.
SMAD4	10-35%	Mutação encontrada na polipose familiar juvenil com risco aumentado de câncer colorretal em mais de 60% dos casos após a terceira ou quarta décadas de vida.
KRAS	35-45%	Pacientes com câncer colorretal estágio IV e mutação de KRAS não respondem a terapia com inibidores de EGFR.

DESENVOLVIMENTO DO CÂNCER COLORRETAL (GENÉTICA MOLECULAR)

O câncer colorretal desenvolve-se a partir de progressão ordenada com alterações genéticas distintas e cumulativas. O pólipo adenomatoso progride lentamente de estágios iniciais benignos até o surgimento do câncer. Fearon e Vogelstein propuseram um modelo de carcinogênese em vários passos. Esse modelo preconiza que as mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes que levam ao surgimento do CCR ocorrem em ordem específica (mutações no gene APC, hipometilação, mutação no gene *K-ras*, mutação do gene DCC e, por último, mutação no gene *p53*)¹¹ (Figura 1). Segundo o modelo, na maioria dos casos a primeira alteração é a inativação do gene APC, contudo, essa mutação isolada não é suficiente para permitir a progressão dos adenomas e, caso não ocorram mutações em outros genes, pode haver regressão. Várias outras proteínas estão envolvidas, como a proteína *K-ras*, que quando mutada ativa uma cascata de sinalização intracelular que promove alterações neoplásicas.¹¹

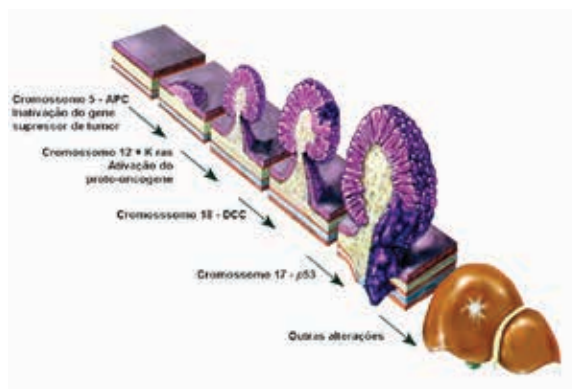


Figura 1 - Sequência adenoma-carcinoma (modificado de Fearon & Vogelstein¹¹).

No decorrer do processo, pode haver deleção do gene supressor de tumor DCC ou de outros genes localizados próximos dele, no cromossomo 18q. O passo final da progressão para o carcinoma é dado com a perda no cromossomo 17p, onde se localiza o gene supressor de tumor *p53*. Alterações genômicas a partir desse ponto contribuem para aumentar o potencial metastático do tumor.¹¹

GENÉTICA DO CÂNCER COLORRETAL E AS SÍNDROMES HEREDITÁRIAS

Polipose adenomatosa familiar

A polipose adenomatosa familiar (PAF) é uma síndrome hereditária autossômica dominante caracterizada pela presença de centenas a milhares de pólipos adenomatosos colorretais, na qual, se não for instituído tratamento cirúrgico, há o desenvolvimento de câncer colorretal em 100% dos casos. É responsável por quase 1% dos casos de CCR.^{3,14-16}

Síndrome de Lynch ou síndrome do câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC)

É síndrome relacionada a mutações na linhagem germinativa dos genes de reparo (*mismatch*), que incluem o carcinoma colorretal, o carcinoma de mama, o carcinoma do endométrio, o carcinoma de ovário, entre outros tipos de neoplasias. Admite-se que aproximadamente 6 a 8% dos casos de CCR podem relacionar-se à HNPCC¹⁷.

É caracterizada, ao contrário da PAF, pela presença eventual de reduzido número de pólipos, em geral localizados à direita. A progressão desses pólipos para carcinoma é rápida, provavelmente porque eles iniciam com mutações nos genes de reparo do DNA e se transformam rapidamente quando se constata mutações no gene APC, fenômeno conhecido com tumorigênese acelerada.¹⁷

Além do diagnóstico por testes genéticos, a síndrome de Lynch pode ser diagnosticada clinicamente pelos critérios de Amsterdam, originalmente introduzidos em 1990 (Tabela 2). Entretanto, por serem muito restritivos, foram propostos os critérios de Bethesda (Tabela 3), que têm sido usados como parâmetros para indicação do teste de instabilidade de microssatélites, base do diagnóstico molecular dessa síndrome hereditária.^{1,3}

Tabela 2 - Critérios de Amsterdam

Pelo menos três casos de câncer colo-retal (CCR), que preencham os seguintes critérios:
Um membro seja familiar em 1º grau dos outros dois;
Pelos menos 2 gerações sucessivas acometidas;
Pelo menos um dos casos de CCR diagnosticado abaixo dos 50 anos;
Polipose adenomatosa familiar deve ser excluída.

Tabela 3 - Critérios de Bethesda revisados para indicação do testes de instabilidade de microssatélite

Pelo menos três casos de câncer colo-retal (CCR), que preencham os seguintes critérios:
Indivíduos com CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
Indivíduos com CCR sincrônicos ou metacrônicos, ou associação com outros tumores do espectro da Síndrome de Lynch ^a , independentemente da idade;
Indivíduos com CCR com características histológicas de instabilidade de alto grau ^b (infiltrado linfocitário, reação Crohn-like, tumores mucinosos ou com diferenciação em "anel de sinete" ou padrão de crescimento medular) diagnosticado em idade inferior a 60 anos;
Indivíduos com CCR em um ou mais familiares de 1º grau com um tumor do espectro da Síndrome de Lynch, um dos quais diagnosticado em idade inferior a 50 anos;
Indivíduos com CCR e dois ou mais familiares de 1º e 2º grau com tumor do espectro da HNPCC, independentemente da idade.

^a tumores do espectro da síndrome de Lynch incluem neoplasias endometriais, gástricas, ovarianas, pelviureterais, biliares e cerebrais (geralmente glioblastomas), adenomas de glândulas sebáceas, ceratoacantomas (como na Síndrome de Muir-Torre) e carcinoma de intestino Delgado. ^b instabilidade de alto grau se refere a alterações em pelo menos dois dos marcadores do painel recomendado pelo National Cancer Institute.

Síndrome de Peutz-jeghers

Trata-se de síndrome autossômica dominante caracterizada por pigmentação melanótica mucocutânea associada a múltiplos pólipos no trato gastrointestinal. É determinada por mutação na linhagem germinativa do gene STK11/LKB1. É rara e sua importância clínica é pouco relevante comparada à HNPCC e à PAF.²⁰

Polipose juvenil familiar

É uma síndrome hereditária autossômica dominante caracterizada pela existência de pólipos formados por componentes do estroma (hamartomas). Nesses pacientes têm sido identificadas alterações germinativas nos genes PTEN e SMAD4. Foi recentemente associada a alto risco de câncer colorretal.^{3,21}

DIAGNÓSTICO GENÉTICO DO CÂNCER COLORRETAL

Os métodos de detecção de mutações podem ser divididos em métodos diretos e indiretos. Os métodos diretos, como o sequenciamento de DNA, documentam a existência de variante genética e revelam sua exata natureza. Embora o sequenciamento de DNA seja o padrão-ouro para a análise de

vários genes, ainda é método bastante trabalhoso e de custo elevado. Por isso, métodos indiretos foram desenvolvidos, como a cromatografia desnaturante líquida de alta performance (DHPLC) que envolve a amplificação por reação em cadeia de polimerase (PCR). Em comparação com o custo do sequenciamento direto, a análise de um fragmento é cerca de 10 vezes menos onerosa com o DHPLC e oito vezes mais rápida.²²

O teste para proteína truncada (PTT) é outro método indireto usado que se baseia na diferença de migração de uma proteína alterada em uma eletroforese em gel. Esse teste é realizado com base na extração de RNA do paciente, geralmente a partir de leucócitos, sendo o mais indicado no diagnóstico de PAF, com sensibilidade aproximada de 65%.

A genética do HNPCC é mais complicada do que a da PAF, pois mutações germinativas em qualquer um dos genes envolvidos com o reparo de DNA podem levar ao surgimento dessa síndrome. Dessa forma, o teste de instabilidade de microssatélites está indicado inicialmente na investigação diagnóstica da síndrome de Lynch, podendo ser realizado por PCR ou, preferencialmente, por imuno-histoquímica.^{16,22} Sua positividade, sobretudo indicando alta frequência de instabilidade (MSI-H), implica a necessidade de determinação direta da mutação por meio do sequenciamento de DNA.²²

MARCADORES PROGNÓSTICOS NO CÂNCER COLORRETAL

Uma relação já estabelecida entre determinada alteração gênica e o prognóstico da doença está sendo avaliada como possibilidade de teste e alguns marcadores já são utilizados com esse objetivo. Sabe-se que a mutação dos genes APC, *hMLH1* e *hMSH2* indica risco muito aumentado de o portador desenvolver CCR e pode ser recomendada a realização de colectomia profilática. Além disso, a deficiência no reparo de DNA, em geral, está associada a melhores prognóstico e resposta ao tratamento quimioterápico adjuvante, baseado no uso de 5' fluorouracil.²³

Outra aplicação dessa tecnologia está na determinação da mutação de *k-RAS* em pacientes com CCR estágio IV. Os pacientes com essa mutação não respondem à terapia inibidora do fator de crescimento epitelial (EGFR), como a cetuximab.²⁴

NOVAS TERAPIAS GÊNICAS PARA O CARCINOMA COLORRETAL

O aumento exponencial do conhecimento da biologia molecular tumoral e da caracterização dos genes envolvidos na gênese e na progressão do câncer oferece opções terapêuticas bastante promissoras. Devido à intensa pesquisa da base genética do CCR, há muito otimismo na aplicação desse conhecimento de biologia molecular na criação de novas formas eficazes de luta contra a doença. A atual geneterapia ainda não permite a substituição dos numerosos genes mutantes relacionados ao CCR, mas já é capaz de direcionar algumas importantes abordagens terapêuticas medicamentosas.

As pesquisas têm se concentrado no desenvolvimento de terapias que têm como alvo produtos de genes com mutações. A terapia dirigida contra o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR), purificado e caracterizado por Cohen em 1980²⁵, tornou-se realidade com a criação de anticorpos anti-HER-1/EGFR, como o cetuximab; ABX-EGF, EMD72000, H-R3 e MDX-447 e anti-HER-2/neu, como trastuzumab e 2C4; e também de agentes que atuam diretamente na enzima tirosina-quinase, como o gefitinib e OSI-774. Como se trata de agentes que especificamente bloqueiam vias críticas para o desenvolvimento e progressão de células neoplásicas, tem-se nova perspectiva de terapêutica oncológica.²⁴⁻²⁶

O receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) é uma glicoproteína da membrana plasmática composta de um domínio de ligação extracelular, de um segmento transmembrana lipofílico e de um domínio intracelular de tirosina-quinase. O EGFR é um membro da família de fatores de crescimento HER que inclui HER-1, HER-2, HER-3 e HER-4, importantes mediadores do crescimento, diferenciação e sobrevivência celular. A ativação do complexo EGFR-tirosina-quinase tem sido identificada como um evento iniciador da cascata de sinalização intracelular levando à proliferação, sobrevivência, angiogênese e metastatização. Kari *et al.*²⁷ demonstraram que as células malignas possuem contato inadequado com a matriz estromal, necessitando da ativação do EGFR para sobreviverem. Contudo, muitas controvérsias têm surgido em torno dos reais benefícios dessas novas terapias, principalmente em relação ao uso das drogas contra o receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) para tratamento de câncer colorretal.²⁴⁻²⁷

Recentemente, pesquisadores alemães realizaram estudo randomizado com o objetivo de avaliar se a melhor taxa de resposta global de cetuximab combinado com oxaliplatina, leucovorin e fluorouracil (FOLFOX-4) foi superior àquela de FOLFOX-4 isolado, como tratamento de primeira linha para o CCR metastático.^{25,26} A influência do estado de mutação do *K-RAS* foi investigada a partir da extração do DNA tumoral e realização de PCR. Apurou-se que pacientes com *K-RAS* selvagem tinham melhor resposta ao tratamento adicionando-se o cetuximab, quando comparados aos pacientes sem a adição dessa droga, e que os pacientes que apresentavam *K-RAS* mutado responderam de maneira muito semelhante ao uso da terapia FOLFOX-4 isolado ou combinado com cetuximab. Os autores concluíram que o estado de mutação do *K-RAS* pode ser considerado critério altamente preditor em relação à decisão do tratamento com a adição de cetuximab ao esquema FOLFOX-4 para pacientes não tratados anteriormente com câncer colorretal metastático.^{25,26}

CONCLUSÃO

O conhecimento em torno da genética do câncer colorretal tem envolvido crescente número de pesquisas, o que tem levado à introdução de novas armas propedêuticas e terapêuticas no combate à doença. Atualmente, o uso de drogas-alvo é realidade, assim como novos testes genéticos têm sido propostos, como a detecção de instabilidade de microssatélite e o sequenciamento de DNA para definição de mutações genéticas específicas relacionadas ao CCR. Entretanto, é necessário reconhecer que, apesar das aplicações dos estudos genômicos serem promissores, existem limitações complexas a serem superadas, de âmbito financeiro e logístico, para que toda tecnologia desenvolvida venha a ser utilizada rotineiramente na prática clínica.

REFERÊNCIAS

1. Markowitz SD, Bertagnolli M. Molecular basis of colorectal cancer. *New Engl J Med*. 2009; 361:2449-60.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Falando sobre câncer do intestino. Rio de Janeiro: INCA; 2003.
3. Vasen HFA. Clinical diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndroms. *J Clin Oncol*. 2000; 18:81s-92s.
4. Jimeno A, Messersmith WA, Hirsch FR, Franklin WA, Eckhardt SG. KRAS Mutations and Sensitivity to Epidermal Growth Factor Receptor Inhibitors in Colorectal Cancer: Practical Application of Patient Selection. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 1; 27(7):1130-6
5. Lièvre A, Bachet JB, Boige V, et al. KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol*. 2008; 20:374-9.
6. Markowitz SD, Bertagnolli M. Molecular basis of colorectal cancer. *New Engl J Med*. 2009; 361:2449-60.
7. Soussi T. The p53 tumor suppressor gene: from molecular biology to clinical investigation. *Ann NY Acad Sci*. 2000; 910:121-37.
8. Bland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 1998; 58:5248-57.
9. Turini ME, DuBois RN. Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. *Annu Rev Med*. 2002; 53:35-57.
10. Yang WL, Frucht H. Activation of the PPAR pathway induces apoptosis and COX-2 inhibition in HT29 human colon cancer cells. *Carcinogenesis*. 2001; 22:1379-83.
11. Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*. 1990; 61:759-67.
12. Sandler RS, Halabi S, Baron JA, et al. A randomized trial of aspirin to prevent colorectal adenomas in patients with previous colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 348:883-90.
13. Giardiello FM, Hamilton SR, Krush AJ, et al. Treatment of colonic and rectal adenomas with sulindac in familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 1993; 328:1313-6.
14. Cetta F, Gori M, Baldi C, et al. The relationships between phenotypic expression in patients with familial adenomatous polyposis (FAP) and the site of mutations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene. *Ann Surg*. 1999; 229:445-6.
15. Vasen HFA, Van der Luijt RB, Slors JFM, Buskens E, De Ruiter P, Baeten CGM, et al. Molecular genetic tests as a guide to surgical management of familial adenomatous polyposis. *Lancet*. 1996; 348:343-5.
16. Bertario L, Russo A, Sala P, et al. Multiple approach to the exploration of genotype-phenotype correlations in familial adenomatous polyposis. *J Clin Oncol*. 2003; 21: 1698-707.
17. Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW et al Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *JAMA*. 2006; 296:1469-78.
18. Rodriguez-Bigas, MA, Boland, CR, Hamilton, SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on nonpolyposis colorectal cancer hereditary syndromes. *J Natl Cancer Inst*. 1997; 89:1758.
19. Piñol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005; 293:1986-94.
20. Jenne DE, Reimann H, Nezu J et al. Peutz-jeghers syndrome is caused by mutations in a novel serine threonine kinase. *Nat Genet*. 1998; 18:38-44.

21. Sayed MG, Ahmed AF, Ringold JR, et al. Germline SMAD4 or BMPRI1A mutations and phenotype of juvenile polyposis. *Ann Surg Oncol*. 2002 Nov; 9(9):901-6.
22. Hamed K, Morton K, Vijay P. The Implications of colorectal cancer molecular biology in clinical practice. *Surg Oncol Clin North Am*. 2008; 17: 341-55.
23. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349:247-57.
24. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2004; 351:337-45.
25. Mendelsohn J. Targeting the epidermal growth factor receptor for cancer therapy. *J Clin Oncol*. 2002; 20:1s-13s.
26. Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349:247-57.
27. Kari CCT, Rocha de Quadros M, Rodeck U, et al. Targeting the epidermal growth factor in cancer: apoptosis takes center stage. *Cancer Res*. 2003; 38:73-80.