

**FREQUÊNCIA DE MUTAÇÕES NOS GENES *MSH6*,
PMS1, *PMS2*, *TP53* E *CHEK2* EM PACIENTES
SUSPEITOS DE SÍNDROME DE LYNCH**

FELIPE CAVALCANTI CARNEIRO DA SILVA

**Tese de doutorado apresentada à Fundação
Antônio Prudente para a obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientador: Dr. Fábio de Oliveira Ferreira
Co-orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro
Co-orientador: Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi**

São Paulo

2011

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Felipe Cavalcanti Carneiro da

Frequencia de mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2* em pacientes suspeitos de Síndrome de Lynch / Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva – São Paulo, 2011.

105p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Fábio de Oliveira Ferreira

Descritores: 1. CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE. 2.REPARO DO DNA. 3.MUTAÇÃO. 4.SÍNDROMES DE CÂNCER HEREDITÁRIO. 5. SINDROME DE LYNCH.

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Walter e Kica, pelo amor incondicional, apoio e exemplo que me transmitem. Vocês são a base de meus princípios e conquistas.

Ao meu avô Walter pelo apoio, incentivo e carinho que sempre demonstrou por mim.

À minha esposa Denise que esteve sempre ao meu lado, incondicionalmente.

AGRADECIMENTOS

À Deus.

À toda minha família, minha esposa Denise, meus pais Walter e Kica, irmãos Daniel e Paula e avós Lourdes e Heloísa.

Ao Meu orientador Dr. Fábio Ferreira que depositou sua confiança em mim e tanto me incentivou.

À Dra. Dirce Maria Carraro pela dedicação e apoio no dia a dia do laboratório.

Ao Dr. Benedito pelos ensinamentos e incentivo.

À Dra. Érika, pelo suporte e paciência.

Aos amigos do Laboratório, Aderbal, Dr. Alex Fiorini, Bruna, Bianca, Cris, Carol, Dra. Elisa, Eloísa, Fran, Gustavo, Giovana, Letícia, Ligia, Louise, Dra. Mariana, Marina, Márcia, Roberto, Rodrigo, Dra. Tatiana.

RESUMO

Silva FC. **Frequência de mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2* em pacientes suspeitos de Síndrome de Lynch.** São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução- A síndrome de Lynch (SL) ou Câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) é uma doença autossômica dominante que predispõe ao câncer colorretal e risco aumentado para câncer de endométrio, estômago, intestino delgado, sistema hepatobiliar, rim, ureter, ovário, tumores de glândulas sebáceas, entre outros. Mutações germinativas nos genes de reparo de DNA (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*, são conhecidos por causar síndrome de Lynch (SL). Além disso, mutações herdadas em *CHEK2* e *TP53* também influenciam o risco de câncer colorretal. Mutações, no primeiro, tem sido identificadas em pacientes com SL, incluindo 1100delC, I157T e IVS2 +1 G> A e, no segundo, tem sido associadas com o câncer gástrico e colorretal no contexto da síndrome de Li-Fraumeni.

Objetivo- O objetivo deste estudo foi determinar a frequência de tumores extracolônicos em famílias com os critérios de Amsterdam e de mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2* em pacientes suspeitos de SL.

Material e Métodos- A fim de avaliar a frequência de tumores colorretais e extracolônicos na SL, foram incluídas 60 famílias não relacionadas que preenchiam, exclusivamente, os critérios de Amsterdam I e II. Para a análise da frequência de mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2*, 71 famílias não relacionadas, negativas para mutações em *MLH1* e *MSH2*, foram incluídas.

Resultados- Para a frequência de tumores avaliados, um total de 2095 indivíduos foram analisados e o câncer colorretal foi encontrado em 334 casos. Tumores extracolônicos foram encontrados em 200 indivíduos, dos quais o câncer de mama (32 casos) foi a manifestação extracolônica mais frequentemente encontrada. Da análise de mutações, observou-se seis novas mutações patogênicas.

Conclusões- 6% dos

pacientes brasileiros com SL desse registro respondem por mutações germinativas nos genes *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*. Dessa forma, reconhecimento de indivíduos e famílias com predisposição hereditária ao câncer através de características clínicas e moleculares, combinado com uma vigilância intensiva, pode contribuir substancialmente para melhorar a caracterização e diagnóstico da SL.

SUMMARY

Silva FC. [Frequency of mutations in *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* and *CHEK2* in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. São Paulo; 2011. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction- Lynch syndrome (LS) or hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominant disorder predisposing to colorectal cancer and increased risk for cancers of the endometrium, stomach, small intestine, hepatobiliary system, kidney, ureter, ovary, sebaceous tumors and others. Germline mutations in the mismatch repair genes (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* and *PMS2* are known to cause Lynch syndrome (LS). Additionally, Inherited mutations in other genes also influence the risk of colorectal cancer, namely *CHEK2* and *TP53*. Mutations in the former have been identified in a subset of patients with LS, including 1100delC, I157T and IVS2+1G>A and the later have been associated with gastric and colorectal cancer in the context of Li-Fraumeni syndrome. **Aim-** The aim of this study was determine the frequency of extracolonic tumors in Amsterdam positive families and frequency of mutations in *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* and *CHEK2* in patients suspected of LS. **Material and Methods-** In order to evaluate the frequency of colorectal cancer and extracolonic tumors, 60 unrelated families fulfilling solely the Amsterdam criteria I and II were included. To analyse the frequency of mutations in *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* and *CHEK2* genes, 71 unrelated families, negative for mutations in *MLH1* e *MSH2*, were included. **Results-** For tumor frequency, a total of 2095 individuals were analysed and colorectal cancer was found in 334 cases. Extracolonic tumors were found in 200 individuals, where breast cancer (32 cases) was the most frequent extracolonic manifestation found. For mutation analysis, we found six novel pathogenic mutations. **Conclusions-** 6% of Brazilian patients with LS from this

institutional registry account for *MSH6*, *PMS1* and *PMS2* genes. Thereby, recognition of individuals and families with hereditary predisposition to cancer according to clinical and molecular features, combined with intensive surveillance and management programs, can contribute substantially to improve results related to the characterization and diagnosis of LS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Modelo de correção de pareamento errôneo dos genes de reparo de DNA.....	16
Figura 2	Método de amplificação do gene <i>PMS2</i> , mostrando as regiões de homologia (em vermelho).....	42
Figura 3	Fluxograma do projeto de rastreamento de mutações.....	47
Figura 4	Frequência de tumores extracolônicos em homens.....	50
Figura 5	Frequência de tumores extracolônicos em mulheres.....	51
Figura 6	Perfil de sequenciamento, MLPA e CGH-Array no paciente SL-030.....	63

LISTA DE QUADRO E TABELAS

Quadro 1	Critérios clínicos de diagnóstico da síndrome de Lynch.....	5
Quadro 2	Critérios de Bethesda.....	5
Tabela 1	Distribuição das famílias e tipos de tumores de acordo com os critérios de Amsterdam.....	49
Tabela 2	Critérios clínicos e tipo de tumores nos 71 indivíduos com a síndrome de Lynch.....	57
Tabela 3	Características clínicas e análise <i>in silico</i> das alterações detectadas no gene <i>MSH6</i>	58
Tabela 4	Características clínicas e análise <i>in silico</i> das alterações detectadas no gene <i>PMS1</i>	69
Tabela 5	Características clínicas e análise <i>in silico</i> das alterações detectadas no gene <i>PMS2</i>	70

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer colorretal
CNVs	Variação do número de cópias
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
gDNA	DNA genômico
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
IHQ	imunoistoquímica
LOH	<i>Loss of heretozygosity</i>
LOVD	<i>Leiden Open Source Variation</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1,</i>
MLH3	<i>mutL homolog 3</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3</i>
MSH6	<i>mutS homolog 6</i>
PMS1	<i>PMS1 postmeiotic segregation increased 1</i>
PMS2	<i>PMS2 postmeiotic segregation increased 2</i>
CDH	<i>Cadherin 1</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSI	<i>Microsatellite instability</i>
MSI-H	<i>Microsatellite instability- high</i>
MSI-L	<i>Microsatellite instability-Low</i>
MSS	<i>microsatellite-Stable</i>
MutS, MutL	<i>DNA mismatch repair protein</i>
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SL	Síndrome de Lynch
ATP	<i>Adenosine-5'-triphosphate</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1	Critérios de Amsterdam e Bethesda	3
2.2	Características clínicas da síndrome de Lynch	5
2.2.1	Herança autossômica dominante	5
2.2.2	Ocorrência de múltiplos tumores	6
2.2.3	Transição adenoma-carcinoma	6
2.2.4	Tumores associados a síndrome de Lynch	7
2.3	Histórico dos genes de reparo de DNA	13
2.4	Genes de reparo de DNA na Síndrome de Lynch	17
2.5	Alterações nos genes de reparo de DNA	19
2.6	Rearranjos genômicos na Síndrome de Lynch.....	21
2.7	Alterações em regiões reguladoras de genes de reparo	22
2.8	Alterações epigenéticas.....	22
2.9	Correlação genótipo-fenótipo	25
2.10	Mutações bialélicas nos genes de reparo de DNA	26
2.11	Outras síndromes associadas ao câncer colorretal não polipomatoso..	27
2.12	Aconselhamento genético	28
2.13	Imunoistoquímica (IHQ) e instabilidade de microssatélites (MSI).....	30
2.14	Diagnóstico da Síndrome de Lynch.....	33
3	OBJETIVOS.....	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1	Amostras	36
4.1.1	Caracterização clínica de famílias Amsterdam.....	36
4.1.2	Rastreamento de mutações por sequenciamento	37
4.2	Aconselhamento genético	38
4.3	Coleta de sangue:	38

4.4	Extração das células brancas do sangue:	38
4.5	Extração de DNA.....	39
4.6	Desenho dos <i>primers</i> :	39
4.7	Reação em cadeia da polimerase (PCR)	40
4.8	PCR de longo alcance (Long range PCR).....	40
4.9	Sequenciamento.....	42
4.10	Amostra referência	43
4.11	Descrição das mutações encontradas.....	44
4.12	Interpretação das alterações do tipo <i>missense</i> já descritas	44
4.13	Interpretação das alterações do tipo <i>missense</i> não descritas	45
4.14	Fluxo de rastreamento de mutações	46
5	RESULTADOS & DISCUSSÃO	48
5.1	Caracterização clínica de famílias Amsterdam.....	48
5.2	Rastreamento de mutações por sequenciamento	56
5.2.1	Gene <i>MSH6</i>	58
5.2.2	Gene <i>PMS1</i>	68
5.2.3	Gene <i>PMS2</i>	69
5.2.4	Gene <i>CHEK2</i>	75
5.2.5	Gene <i>TP53</i>	76
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	78
7	CONCLUSÕES	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	81

ANEXOS

- Anexo 1** Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para indivíduos com Câncer Colorretal com Sequenciamento de *hMLH1* e *hMSH2* Inconclusivo
- Anexo 2** Purificação de DNA
- Anexo 3** Hibridação genômica comparativa (CGH-ARRAY)
- Anexo 4** MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*)
- Anexo 5** Extração das células brancas do sangue
- Anexo 6** Características clínicas dos indivíduos, descrição resultados das análises *in silico* das alterações detectadas nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *CHEK2* e *TP53*
- Anexo 7** Heredograma das famílias com alteração identificada

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal é uma das doenças neoplásicas mais comuns de todo o mundo. Nos últimos anos, a incidência de câncer colorretal (CCR) parece ter atingido níveis altíssimos, aumentando em áreas anteriormente consideradas de baixo risco. De acordo com FERLAY et al (2010), estima-se 1.200.000 novos casos de câncer colorretal todos os anos. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento natural das populações, à adoção de estilos de vida sedentários e dietas pouco saudáveis. Apesar de a mortalidade estar diminuindo nos últimos anos, graças aos avanços nas técnicas de diagnósticos, ainda há cerca de mais de um milhão de óbitos todos os anos no mundo (FRANCO e DUARTE-FRANCO 2005).

O câncer colorretal é um problema de saúde pública em todo o mundo, ele hoje é o segundo câncer mais prevalente, ficando atrás somente do câncer de mama (FERLAY et al. 2010). A maior parte de novos casos é diagnosticada em países desenvolvidos, principalmente na Europa Ocidental e Nordeste dos Estados Unidos, porém, só para o ano de 2010, estima-se 48.000 novos casos de câncer colorretal no Brasil, sendo o quarto tipo de câncer mais frequente em homens e o terceiro tipo mais frequente em mulheres (Ministério da Saúde 2009; FERLAY et al. 2010).

Das formas mais comuns de tumores, o câncer colorretal tem uma das maiores proporções de casos familiares. Através de estudos baseados em agrupamentos familiares, verificou-se que cerca de 20-30% dos tumores

colorretais possuem uma causa genética potencialmente identificável (JOHNS e HOULSTON 2001; GRADY et al. 2003; JASPERSON et al. 2010). Além disso, as conhecidas síndromes hereditárias associadas com mutações herdadas de alta penetrância respondem por cerca de 6-8% de todos os casos de CCR. Elas são caracterizadas por um processo carcinogênico facilitado, com aumento do risco de desenvolvimento de CCR em relação aos casos esporádicos, onde a penetrância, de algumas mutações, pode chegar a 100% dos casos (FEARNHEAD et al. 2002; GOECKE et al. 2006). O restante, cerca de 70%, são tumores esporádicos (LYNCH et al. 2009b).

As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC - *Hereditary NonPolyposis Colorectal Cancer*), também chamada de Síndrome de Lynch (SL) (LYNCH e DE LA CHAPELLE 1999; HENDRIKS et al. 2006a).

2 REVISÃO DE LITERATURA

A Síndrome de Lynch (SL) representa de 2-4% dos casos de câncer colorretal (VASEN et al. 2010), sendo caracterizada por um processo de carcinogênese acelerada decorrente de mutações em genes do sistema de reparo de DNA (LYNCH et al 1993; MARRA et al. 1995; LYNCH et al. 1997). Os principais genes envolvidos são o *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2*, *MSH6* e *MLH3* (PELTOMAKI e VASEN 1997; VASEN et al. 1999). Alterações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* são encontradas em cerca de 90% de famílias portadoras de mutação. De acordo com a base de dados InSIGHT, atualmente existem mais de 450 diferentes mutações patogênicas, 50% relacionadas ao *MLH1*, 40% ao *MSH2* e 10% distribuídas entre os demais (PAPP et al 2007).

2.1 CRITÉRIOS DE AMSTERDAM E BETHESDA

VASEN et al. (1991), reportou os esforços do Grupo Colaborativo Internacional sobre HNPCC (ICG-HNPCC) e o estabelecimento de um grupo de critérios seletivos para famílias com a síndrome de Lynch (Critério de Amsterdam I): 1) pelo menos três parentes com câncer colorretal histologicamente confirmado; 2) um ser parente de primeiro grau dos outros dois; 3) pelo menos duas gerações sucessivas afetadas; 4) pelo menos um dos parentes com o diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos; e 5) FAP deve ser excluída. Porém, verificou-se que diferentes sítios primários

eram frequentemente descritos em famílias com um possível diagnóstico de síndrome de Lynch: endométrio, estômago, ovário, intestino delgado, ureter, pélvis renal, cérebro e câncer do trato hepatobiliar. Entre esses tumores, o câncer de endométrio, ureter, pélvis renal e intestino delgado, possuíam um risco relativo maior, sendo, deste modo, mais específicos da síndrome de Lynch. Dessa forma, no encontro realizado em 1998 houve um acordo de que esses tumores extracolônicos deveriam ser incluídos e, um novo grupo de critérios clínicos foi proposto (Critério de Amsterdam II [ACII]) (VASEN et al. 1999). Em 1997, com os avanços na patologia dos tumores, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) propôs algumas recomendações, conhecidas como critérios de Bethesda (Quadro 2), com o intuito de identificar indivíduos suspeitos para a Síndrome de Lynch, através da investigação da instabilidade de microssatélites (MSI) (BOLAND et al. 1998). O diagnóstico da MSI serviria como um teste de rastreamento para um subsequente sequenciamento dos principais genes de reparo (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997).

Quadro 1 - Critérios clínicos de diagnóstico da síndrome de Lynch.

<p>Critérios de Amsterdam I</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pelo menos três parentes devem ter CCR verificado histologicamente; -Um tem que ser parente de 1 grau dos outros 2; -Pelo menos duas gerações sucessivas têm de ser afetadas; -Pelo menos um dos parentes com CCR tem de ter recebido o diagnóstico antes dos 50 anos; -Polipose adenomatosa familiar tem de ser excluída.
<p>Critérios de Amsterdam II</p> <ul style="list-style-type: none"> -Pelo menos três parentes com um câncer associado à síndrome de Lynch (CCR, estômago, ovário, endométrio, ureter ou pélvis renal, cérebro, intestino delgado, trato hepatobiliar e pele (sebáceo)); -Um tem que ser parente de 1º grau dos outros dois; -Pelo menos duas gerações sucessivas têm de ser afetadas; -Pelo menos um dos parentes com CCR tem de ter recebido o diagnóstico antes dos 50 anos; -Polipose adenomatosa familiar tem de ser excluída; -Tumores têm de ser verificados sempre que possível.

Quadro 2 - Critérios de Bethesda.

<p>Critérios de Bethesda</p> <ul style="list-style-type: none"> -Câncer colorretal diagnosticado antes dos 50 anos; -Presença de câncer colorretal sincrônico e/ou metacrônico ou outros tumores relacionados à síndrome, independente de idade; -Câncer colorretal com instabilidade de microssatélite alta, diagnosticado antes dos 60 anos; -Paciente com câncer colorretal e um parente com tumor relacionado com a síndrome, comum dos cânceres diagnosticados antes dos 50 anos; -Paciente com câncer colorretal com dois ou mais parentes de 1º e 2º grau com tumores relacionados a síndrome, independente da idade.
--

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DA SÍNDROME DE LYNCH

2.2.1 Herança autossômica dominante

Na herança autossômica dominante somente uma cópia mutada do gene é suficiente para que a pessoa desenvolva a doença. Sendo assim, um indivíduo que herdou a mutação tem 50% de probabilidade de transmitir o

gene mutado aos seus descendentes, independentemente do sexo (VASEN 2005).

2.2.2 Ocorrência de múltiplos tumores

Uma das características da SL é a ocorrência de múltiplos tumores primários no mesmo paciente. Numa série de 477 pacientes com câncer colorretal, pertencentes a famílias portadoras de mutações nos genes de reparo, 18% dos casos tiveram tumores sincrônicos e metacrônicos (VASEN. 2005). No Brasil, CANDIDO et al. (2007) avaliando 212 pacientes com CCR, verificaram que 10% deles haviam tido múltiplos tumores primários e 6% se tratavam de tumores colorretais sincrônicos ou metacrônicos. Devido ao grande aumento no risco de desenvolver um segundo tumor colorretal, alguns autores recomendam uma extensiva ressecção colônica, principalmente em pacientes jovens (DE VOS TOT NEDERVEEN CAPPEL et al. 2003).

2.2.3 Transição adenoma-carcinoma no CCR

A transição adenoma-carcinoma, inicialmente caracterizada em pacientes com Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), (FEARON e VOGELSTEIN 1990) também se aplica a SL. Um recente estudo mostrou que pacientes com mutações nos genes de reparo desenvolvem adenomas mais frequentemente que controles, onde indivíduos com SL têm uma razão adenoma-carcinoma de 1:1, enquanto que a população geral é de 30:1.

Desta forma, acredita-se que qualquer pólipó não tratado, nesses pacientes, irá sofrer uma transformação maligna (JASS et al. 2002; SILVA et al. 2009).

Adenomas de portadores de mutações costumam ser mais largos e em maior proporção, apresentando características histológicas que estão associadas com um alto risco de malignização, tais como: alto grau de displasia e presença de arquitetura vilosa. Adenomas e carcinomas na SL estão predominantemente localizados no cólon proximal e a média do surgimento do primeiro pólipó é em torno de 43 anos, e do carcinoma é de aproximadamente 46 anos de idade (JASS et al. 1994). No estudo conduzido por CANDIDO et al. (2007), no Brasil, foram avaliadas 43 famílias com a SL, e o tumor colorretal proximal foi o mais achado, com uma média de idade de 46 anos.

Uma proporção, relativamente alta, de pacientes, desenvolve CCR dentro de três anos após uma colonoscopia normal, sugerindo que a sequência adenoma-carcinoma é acelerada, e a progressão de adenoma para carcinoma seria capaz de levar menos de três anos, diferentemente de tumores esporádicos, que levam em média de 10 a 15 anos (VASEN 1995).

2.2.4 Tumores associados à síndrome de Lynch

Câncer colorretal

Os tumores colorretais são, em sua maioria, pouco diferenciados, com presença de células em anel de sinete e excesso de áreas mucóides. Em geral, apresentam reação do tipo *Crohn's-like*, com um conteúdo significativo

de linfócitos infiltrantes no tumor. Além disso, são freqüentes a presença de adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos e múltiplos ceratoacantomas na síndrome de Muir-Torre, uma variante da Síndrome de Lynch (LYNCH et al. 2006).

Câncer de endométrio

O câncer de endométrio associado à SL é diagnosticado 10 anos antes do que nos casos esporádicos. Aproximadamente 2% de todos os tumores endometriais estão relacionados à SL (HAMPEL et al. 2006). De acordo com os dados obtidos no registro de câncer colorretal hereditário do Hospital A.C. Camargo, a média de idade de diagnóstico de câncer endometrial, na SL, é de 48 anos (CANDIDO et al. 2007).

Num estudo recente realizado no Brasil, COSSIO et al. (2010) verificaram que 40% dos pacientes com diagnóstico de câncer de endométrio, com ou sem histórico familiar de tumores relacionados a síndrome de Lynch, apresentaram alterações em pelo menos um dos genes de reparo de DNA. Além disso, os autores afirmam que cerca de 11% dos tumores endometriais, diagnosticados antes dos cinquenta anos de idade, podem estar relacionados com mutações nos genes de reparo de DNA.

A grande maioria dos tumores endometriais da síndrome de Lynch é do tipo endometrióide, com variados estadios e graus (DE LEEUW et al. 2000). Características histopatológicas, como diferenciação mucinosa, padrão de crescimento sólido-cribiforme, alto grau de necroses sugerem o envolvimento dos genes de reparo de DNA. VAN DEN BOS et al. (2004)

verificaram que o câncer endometrial, na SL, são caracterizados por pouca diferenciação, com frequente reação linfóide *Crohn's-like*, crescimento linfangioinvasivo e com muito mais linfócitos infiltrantes, quando comparados com os casos esporádicos.

Câncer de ovário

A média de diagnóstico de câncer de ovário, na SL, é de aproximadamente 10 anos a menos que nos casos esporádicos. No Brasil, a média de idade em famílias com a SL é de 45 anos (CANDIDO et al. 2007). Um estudo conduzido por CRIJNEN et al. (2005) verificou-se que a média de idade de câncer de ovário foi de 49 anos, contra 60 dos casos esporádicos. Segundo os autores, as taxas de sobrevida não foram significativamente diferentes quando comparadas com controles ajustados para a idade, estadió e ano de diagnóstico. Além disso, a patologia dos tumores de ovário, da SL, aparentemente não apresentava diferenças entre os casos esporádicos.

Câncer gástrico

Tumores de estômagos têm sido observados, principalmente, nas gerações mais antigas de países ocidentais desenvolvidos, mas é um dos mais frequentes tumores extracolônicos nas atuais gerações da SL em países orientais e ocidentais em desenvolvimento (CANDIDO et al. 2007; YAP et al. 2009; ALVAREZ et al. 2010). Um estudo Finlandês reportou dados clínicos de 45 pacientes com câncer gástrico em 51 famílias da SL,

onde a média de idade de diagnóstico foi de 56 anos e o tipo intestinal o mais frequente (AARNIO et al. 1997). No Brasil, o tumor gástrico foi o terceiro tipo mais comum de manifestação extra-colônica em 43 famílias da SL, com uma média de diagnóstico de 51 anos (CANDIDO et al. 2007).

Câncer de intestino delgado

Um estudo internacional, incluindo vários registros institucionais, identificou 42 indivíduos de 40 famílias que desenvolveram 42 tumores primários, além de sete casos metacrônicos de câncer de intestino delgado, onde 46 deles foram adenocarcinomas e os outros três, do tipo carcinóide. O duodeno e jejuno foram os sítios primários mais comuns do tumor, embora tenha havido alguns casos na região do íleo. A média de idade ao diagnóstico do primeiro tumor primário foi de 49 anos (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1998).

SCHULMANN et al. (2005) num estudo com famílias alemãs, identificou 32 casos de câncer de intestino, com a média de idade de 39 anos, onde 50% dos tumores estavam localizados no duodeno. A instabilidade de microssatélites foi detectada em 95% dos tumores e em 89% dos casos houve a perda de expressão protéica de pelo menos um dos genes de reparo de DNA. Baseado nesses achados, o grupo propôs uma endoscopia de vigilância do duodeno em pacientes portadores de mutação nos genes de reparo a partir dos 30 anos de idade.

Câncer de ureter e pélvis renal

São poucas as informações a respeito de tumores do trato urinário associados à SL. Em um registro holandês, foram identificados sete casos de câncer de ureter e pélvis renal em 50 famílias com a SL, onde a média de idade foi de 58 anos e todos os casos apresentaram carcinoma de células transicionais (SIJMONS et al. 1998). Num estudo de coorte de quatro grandes centros (Dinamarca, Finlândia, Holanda e EUA) foram avaliados 6041 familiares de 261 famílias com a SL, onde foram encontrados 98 casos de tumores no trato urinário, com um risco estimado de 28% de desenvolver o tumor ao longo da vida para homens. De acordo com o estudo, o período de maior risco para a ocorrência do tumor é em torno dos 50-70 anos de vida (WATSON et al. 2008).

Câncer de Sistema nervoso central (SNC)

A associação entre SL e tumores cerebrais foi relatada em diferentes estudos. VASEN et al. (1996a) estudaram 1.321 indivíduos de 50 famílias que preenchiam os critérios de Amsterdam. O registro revelou 14 casos de tumores do SNC: cinco astrocitomas, três oligodendrogliomas, um ependimoma e cinco tumores para os quais o relatório patológico não estava disponível. O risco relativo de tumor no cérebro em pacientes com SL e seus familiares de primeiro grau foi seis vezes maior que na população geral (IC:95%; RR 3,5-10,1). Após a exclusão dos casos cujo diagnóstico foi baseado apenas na história da família, o risco relativo foi de 4,3 (IC:95%; RR

2,3-8,0). Embora o risco relativo de tumor cerebral seja aumentado, não é recomendado o rastreamento.

Câncer do trato hepatobiliar e pâncreas

MECKLIN et al. (1992) avaliaram 18 pacientes com carcinoma biliopancreático em 15 diferentes famílias com câncer familiar. Em 11 (79%), o diagnóstico foi de carcinoma de vias biliares ou da papila de Vater, e em três (21%), carcinoma de pâncreas. VERNEZ et al. (2007) relatam um caso de síndrome de Muir-Torre com colangiocarcinoma intra-hepático associado com uma mutação *missense* do gene *MSH2*.

Câncer de glândulas sebáceas

A síndrome de Muir-Torre (MTS), é conhecida como uma variante da SL, caracterizada pela coexistência de tumores de glândulas sebáceas e/ou ceratoacantomas e malignidades viscerais típicas da SL, principalmente o câncer colorretal (CCR) (CESINARO et al. 2007; EISEN e MICHAEL 2009)

As lesões sebáceas associadas à síndrome podem ser únicas ou centenas e são quase sempre encontradas na pele da face, mas podem aparecer em qualquer parte do corpo (PONTI 2005; MANGOLD et al. 2004; ORTA et al. 2009). Os adenomas sebáceos têm sido considerados a lesão sebácea mais comumente encontrada na MTS (COHEN et al. 1991; KIM et al. 2007). Estas lesões ocorrem geralmente no tronco quando associadas à MTS, diferentemente da sua localização na face quando ocorrem de forma esporádica (SINGH et al. 2008). A análise de mutações dos genes de reparo

em famílias diagnosticadas com a síndrome de Muir-Torre demonstrou uma prevalência maior para mutações nos genes *MSH2* e *MLH1*, com prevalência para mutações no gene *MSH2*. (MANGOLD et al. 2004; PONTI 2005; ORTA et al. 2009; PONTI et al. 2007)

2.3 HISTÓRICO DOS GENES DE REPARO DE DNA

A função primária do sistema de reparo de DNA é corrigir o erro de pareamento de bases, inserções e deleções que surgem como consequência do erro da DNA polimerase durante a síntese de DNA. Os genes de reparo cumprem diversas funções na estabilização genética, seja corrigindo erros na síntese de DNA, garantindo a fidelidade da recombinação genética ou participando nos passos iniciais de respostas apoptóticas a diferentes classes de danos ao DNA (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000; PELTOMAKI 2001).

Os primeiros estudos de genes de reparo foram desenvolvidos em *Escherichia coli*, onde o reparo do erro de pareamento é caracterizado pela ausência de metilação de adenina no sítio d(GATC) dentro do novo DNA sintetizado. Dessa forma, o funcionamento da fita hemimetilada em *E. coli* direciona o corte na fita não metilada, servindo como um sinal para a reação (IYER et al. 2006). O sinal que dirige a correção do erro de replicação em eucariotos ainda não é bem definido, porém, similarmente ao que ocorre em bactérias, um corte específico da fita ou abertura é suficiente para direcionar o reparo em extratos de células de mamíferos. Essa descoberta, aliada ao

fato de que o reparo é mais eficiente na fita descontínua da forquilha de replicação, sugere que o término do DNA, que ocorre como intermediador natural durante a replicação (término 3' na fita contínua e terminos 3' e 5' da fita descontínua), pode ser suficiente para funcionar como sinalização para correção dos erros em células eucarióticas (MODRICH 2006).

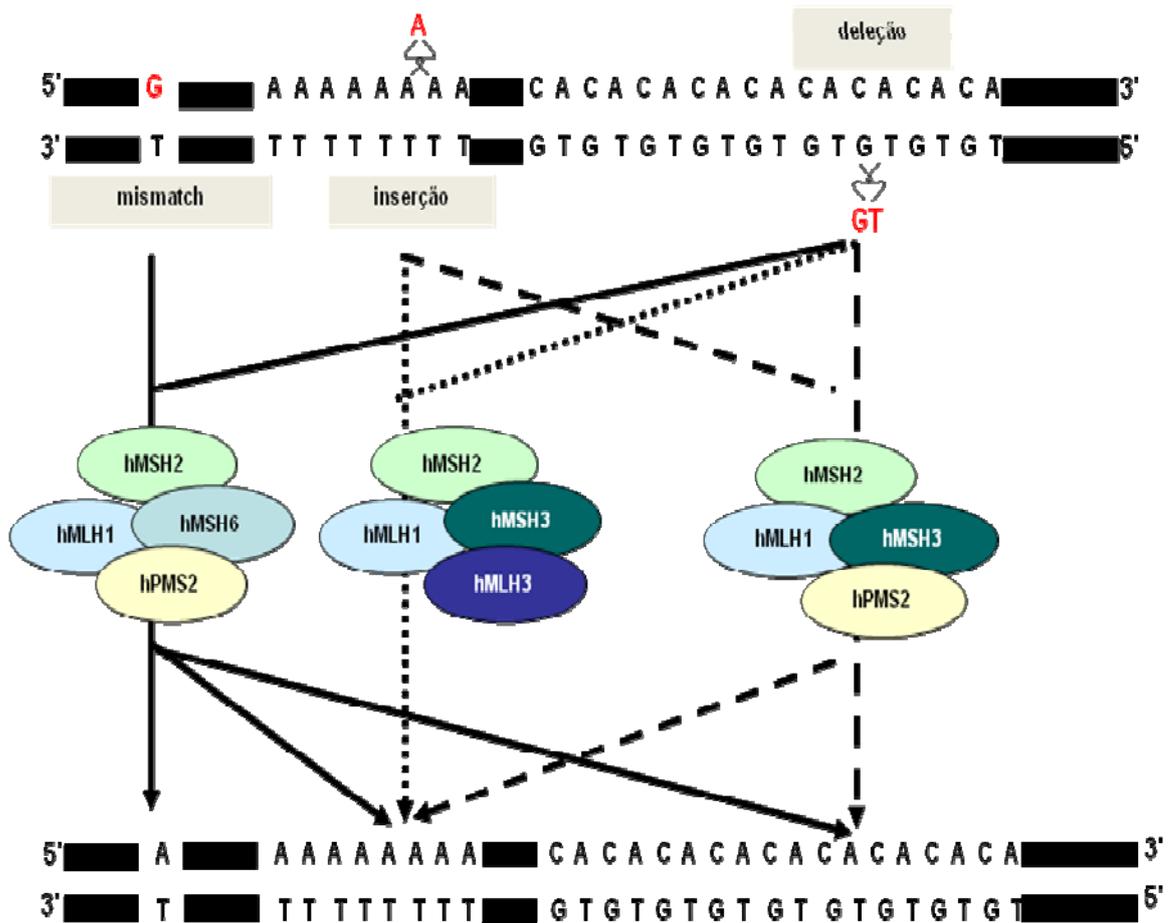
Os homodímeros responsáveis pela iniciação do reparo do erro de pareamento em *E. coli* são o MUTS e MUTL. MUTS faz o reconhecimento do erro de pareamento e recruta o MUTL para o local do reparo, iniciando uma cascata de atividades (PELTOMAKI 2005; MODRICH 2006). As células de mamíferos possuem a atividade de dois MUTS homólogos que funcionam como heterodímeros, onde o MUTS α é formado pelo complexo MSH2-MSH6 e o MUTS β formado pelo complexo MSH2-MSH3 (KOLODNER 1999a). PELTOMAKI (2005) identificou seis homólogos ao MUTS em células de eucariotos.

O complexo MSH2-MSH6 representa 80% a 90% do nível celular de MSH2 e sua função é reconhecer o erro de pareamento base-base, inserções e deleções que contenham um ou dois nucleotídeos não pareados, além de reconhecer grandes deleções e inserções (MODRICH 2006). Acredita-se que a proteína MSH6 aparenta ser a subunidade responsável pelo reconhecimento do erro de pareamento (LACCARINO et al. 1998).

O complexo MSH2-MSH3 é responsável pelo reconhecimento e reparo de inserções e deleções de dois a oito nucleotídeos. Estudos experimentais não demonstraram associação do gene *MSH3* com a

Síndrome de Lynch (HUANG et al. 2001; OHMIYA et al. 2001), embora o gene apresente frequentes mutações somáticas em tumores e sua inativação possa potencializar as consequências de mutações em outros genes de reparo.

As células eucarióticas apresentam, também, três complexos homólogos ao MUTL de *E. coli*, sendo eles: o MLH1-PMS2 (MUTL α), o MLH1-PMS1 (MUTL β) e o MLH1-MLH3 (MUTL γ). O complexo MUTL α constitui o complexo mais ativo em seres humanos e atua como suporte para o reparo iniciado pelo complexo MUTS (IYER et al. 2006). O complexo MUTL β já foi isolado, porém seu envolvimento no reparo de DNA ainda não está bem esclarecido, assim como o envolvimento do gene *MLH3* no desenvolvimento de tumores colorretais (LOUKOLA et al. 2000).



Fonte: Figura adaptada de JIRICNY (2000).

Figura 1 - Modelo para correção de pareamento errôneo dos genes de reparo de DNA. A fita na parte de cima contém 3 erros que são corrigidos pelo sistema de reparo: um pareamento base-base, uma inserção e uma deleção de duas bases. Os três erros são alvo dos complexos MSH2-MSH6/MLH1-PMS2 para a correção. Em todos os casos o processo é dirigido por um curto corte na fita. Na ausência de MSH6, as inserções e deleções são reparadas pelo complexo MSH2-MSH3.

2.4 GENES DE REPARO DE DNA NA SÍNDROME DE LYNCH

O entendimento clínico da Síndrome de Lynch tem sido complementado pelos grandes avanços da genética molecular. A primeira caracterização molecular desses tumores ocorreu no início dos anos 90, com a caracterização da instabilidade de microssatélites (THIBODEAU et al. 1993), onde verificaram que pacientes com a síndrome de Lynch apresentavam variações no número de repetições nas unidades de microssatélites, ocasionadas pela falha no sistema de correção de genes de reparo de DNA.

A definição molecular da Síndrome de Lynch requer a demonstração de um defeito herdado nos genes de reparo. Assim, mutações germinativas em pelo menos um dos genes de reparo podem ser encontradas em mais de 80% dos indivíduos com Síndrome de Lynch (PELTOMAKI 2003).

O gene *MLH1* (MIM#120436) localiza-se no cromossomo 3p21, possui dezenove éxons com 74.745 pares de base. Até o ano de 2009, mais de 500 diferentes mutações germinativas são conhecidas e é o mais importante gene de susceptibilidade ao câncer na síndrome de Lynch (PELTOMAKI e VASEN 2004).

O gene *MSH2* (MIM#120435) encontra-se no cromossomo 2p16, possui dezesseis éxons e 104.128 pb (PELTOMAKI 2003). Mutações nos genes *MSH2* e *MLH1* representam mais de 80% dos casos com mutações germinativas na SL (WIJNEN et al. 1997; ROSSI et al. 2002).

O gene *MSH6* encontra-se no cromossomo 2p15, com 10 éxons e mutações germinativas têm sido reconhecida como frequente causa de Síndrome de Lynch atípica (sem preencher critérios de Amsterdam). Os primeiros estudos sobre mutações no gene *MSH6* indicaram que o fenótipo clínico de famílias afetadas se difere dos indivíduos de Síndrome de Lynch clássica, causados por mutações em *MLH1* e *MSH2*. A penetrância do câncer colorretal parece diminuir, embora câncer endometrial seja, provavelmente, a mais importante manifestação clínica em mulheres que apresentam mutação em *MSH6*. Além disso, indivíduos portadores de mutações em *MSH6* têm reduzida incidência de instabilidade de microssatélites e preferencialmente ocorrem em sequências de mononucleotídeos (WJNEN et al. 1999; MIYAKI et al. 1997; AKIYAMA et al. 1997; PLASCHKE et al. 2000; KOLODNER et al. 1999b; NAKAGAWA et al. 2004).

Os genes *PMS1* e *PMS2* estão localizados no cromossomo 2q31-q33 e 7p22, com 13 e 15 éxons, respectivamente. Segundo dados de literatura, representam 5% dos casos da Síndrome de Lynch (KOLODNER et al. 1999b). Apesar do gene *PMS2* ser crucial no papel de reparo, mutações têm sido raramente reportadas como causadoras da síndrome de Lynch e síndrome de Turcot, uma de suas variantes (JASS 2006).

2.5 ALTERAÇÕES NOS GENES DE REPARO DE DNA

ROSSI et al. (2002), avaliando vinte e cinco famílias brasileiras com suspeita de síndrome de Lynch, analisaram mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* e verificaram que das dez mutações encontradas (40%), oito delas foram encontradas no gene *MLH1* (80%) e duas em *MSH2* (20%). As principais mutações foram cinco do tipo *missense*, uma *nonsense*, três *frameshift* e uma de sítio de *splicing*. LYNCH et al. (1999), identificaram mutação em dezoito de cinquenta e seis indivíduos (32,1%).

NICOLAIDES et al. (1994), sugeriram pela primeira vez o papel dos genes *PMS1* e *PMS2* como parte da Síndrome de Lynch. Esses autores identificaram uma deleção *inframe* para *PMS2* e uma mutação *nonsense* em *PMS1* em duas famílias não relacionadas.

Devido à descoberta de um gene homólogo ao *PMS2*, também localizado no cromossomo 7p22-23, denominado *PMS2CL*, o qual apresenta 97% de similaridade com *PMS2* e semelhança com a região na qual a proteína *PMS2* interage com a proteína *MHL1* para formar o complexo *MLH1-PMS2*, verificou-se que esse gene seria capaz de gerar falsos alelos não mutados (*wild-type*), dificultando bastante o rastreamento de mutações em *PMS2* (NAKAGAWA et al. 2004). De acordo com dados do *National Center for Biotechnology Information Database* (NCBI) existem pelo menos treze sequências homólogas ao *PMS2* em diferentes cromossomos. NAKAGAWA et al. (2004), afirmaram que a presença do gene *PMS2CL* dificulta a detecção de mutações *frameshift* pelo método de sequenciamento

e, afirmam ainda, que o fato de poucas mutações encontradas nos éxons 1 a 5 do *PMS2* poderiam ser devido à existência de outras regiões homólogas, sugerindo que as mutações em *PMS2* podem ser muito mais comuns do que se imaginava.

No ano de 2000, DE ROSA et al. encontraram duas mutações *missense* em *PMS2* em um paciente com síndrome de Turcot sem histórico familiar. Neste estudo, o paciente era jovem e as mutações foram herdadas de seu pai e sua mãe, que eram heterozigotos para o gene *PMS2*. Interessantemente, ambos os pais e outros cinco membros da família que eram heterozigotos para uma das mutações, não apresentaram tumores, levando os autores a sugerirem que alterações em heterozigose nesse gene não aumentariam o risco de câncer. Essa descoberta levou os pesquisadores a interpretarem que seria necessária uma inativação bialélica do gene *PMS2* para produzir uma predisposição ao câncer, confirmando a idéia do modelo de *two-hit* proposto por KNUDSON (1971).

Um estudo recente realizado por HENDRIKS et al. (2006b), identificou sete mutações em *PMS2*, incluindo quatro rearranjos cromossômicos e três mutações pontuais. Desses sete indivíduos, seis apresentaram um padrão de herança autossômico dominante. Esses estudos indicaram fortemente que mutações heterozigóticas em *PMS2* são causadoras da Síndrome de Lynch, contradizendo os achados de DE ROSA et al. (2000).

2.6 REARRANJOS GENÔMICOS NA SÍNDROME DE LYNCH

Com o surgimento da *Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification* (MLPA) foi possível reconhecer, surpreendentemente, uma grande proporção de mutações deletérias resultantes de rearranjos genômicos de uma ou de várias deleções de éxons, afetando o gene *MLH1* e *MSH2* (NAKAGAWA et al. 2003).

AINSWORTH et al. (2004) verificaram uma taxa significativa de rearranjos genômicos em dez de 67 indivíduos suspeitos para a SL (15%), sendo cinco diferentes tipos de rearranjos. ZHANG et al. (2006) avaliaram dezesseis familiares suíços suspeitos de síndrome de Lynch que não apresentavam mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* e encontraram cinco indivíduos (31%) com diferentes deleções genômicas.

Segundo PITORIUS et al. (2007), os rearranjos genômicos representam uma significativa proporção de todas as mutações patogênicas nos genes de reparo de DNA. São vários os estudos que mostram que os rearranjos genômicos compreendem de 15% a 55% de todas as mutações nos genes de reparo (WIJNEN et al. 1998; GILLE et al. 2002; WAGNER et al. 2003; WANG et al. 2003; BUNYAN et al. 2004; BAUDHUIN et al. 2005; GRABOWSKI et al. 2005). PISTORIUS et al. (2007) encontraram catorze rearranjos genômicos, num total de oitenta e cinco indivíduos (16,5%), sendo quatro deles em *MLH1* e outros dez em *MSH2*.

2.7 ALTERAÇÕES EM REGIÕES REGULADORAS DE GENES DE REPARO

Embora se tenha pesquisado muito sobre as alterações genéticas em regiões codificadoras dos genes de reparo em Síndrome de Lynch, as alterações genéticas nas regiões regulatórias desses genes têm sido pouco investigadas. Estudos recentes têm definido e caracterizado mutações germinativas na região central dos promotores desses genes. SHIN et al. (2002) avaliando cento e quarenta e um pacientes coreanos com Síndrome de Lynch, encontraram três novas mutações na região promotora do gene *MSH2*, sendo todos os indivíduos com mutações germinativas não detectadas. Essas mutações na região promotora diminuíram de maneira significativa sua atividade, afetando o início do sítio de transcrição e o sítio de ligação do fator transcricional, resultando num novo complexo DNA-proteína. Esses resultados são indicativos de que mutações na região promotora de *MSH2* são responsáveis pelo processo inicial de tumores em uma minoria de casos de Síndrome de Lynch.

2.8 ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

GAZOLLI et al. (2002) demonstraram que 60% a 90% das ilhas CpG são metiladas no resíduo de citosina no genoma humano, embora regiões ricas em CG sem metilação sejam frequentemente associadas a genes ativos (TATE e BIRD 1993). Alterações epigenéticas no genoma humano

podem afetar a citosina como também a estrutura da cromatina (ROUNTREE et al. 2001; MIYAKURA 2004). O resíduo de citosina pode adquirir um grupo metil no seu carbono 5, ocorrendo na fita contrária a sequência palindrômica de CpG. Na grande maioria dos genes expressos, as ilhas CpG são encontradas na região promotora e, dependendo do nível de metilação, podem impedir os fatores de transcrição de se ligarem na região promotora, inibindo a transcrição, e como consequência, o gene é silenciado.

Estudos têm demonstrado que a hipermetilação, conhecida também como epimutação, do gene *MLH1* não está limitado a células neoplásicas. Em certos indivíduos, a hipermetilação de um único alelo é originada durante sua germinação e é amplamente distribuída em suas células somáticas (TATE e BIRD 1993; SUTER et al. 2004; HITCHINS et al. 2005).

Embora mutações germinativas em sequências de genes sejam fielmente transmitidas de uma geração a outra num padrão mendeliano, as epimutações, apesar de serem transmitidas aos descendentes, não envolvem mudanças na sequência de DNA e são relativamente instáveis, devido ao processo de reprogramação epigenética nas células gaméticas. HITCHINS et al. (2007) avaliando vinte e quatro pacientes com câncer colorretal ou de endométrio, antes dos cinquenta anos sem mutações germinativas nos genes de reparo, verificaram que duas pacientes apresentavam uma típica epimutação germinativa em *MLH1*, com todas as suas células somáticas hemimetiladas. Um dos filhos de uma das pacientes apresentou uma metilação parcial em *MLH1*, porém, a análise dos

espermatozoides do menino não demonstrou qualquer perfil de metilação nesse gene. Na outra paciente, apesar de ter doado seu haplótipo a um de seus filhos, não foi encontrada evidência de metilação, provavelmente devido a uma reversão durante a gametogênese. Esses resultados sugerem uma reversão incompleta da epimutação, com a possibilidade de uma maior susceptibilidade do alelo doado sofrer uma subsequente metilação somática na geração seguinte.

HITCHINS et al. (2005), em um estudo prévio, avaliaram 160 indivíduos suspeitos de Síndrome de Lynch e verificaram que uma paciente apresentou hemimetilação no gene *MLH1* e que esse alelo foi herdado de sua mãe. Dessa forma, esses resultados, afirmam que erros epigenéticos podem surgir mais frequentemente durante a oogênese ou se manterem de uma maneira mais forte durante esse processo. Essa hipótese pode ser confirmada pela reversão da epimutação no filho da paciente, embora não possamos excluir a herança paterna, visto que SUTER et al. (2004) verificaram a presença de metilação nos espermatozoides de um dos descendentes de uma das pacientes portadoras de hipermetilação, mesmo que em uma baixa proporção (<1%).

Até o momento, essas observações sugerem que a hipermetilação associada ao silenciamento do *MLH1* representa uma alternativa no modelo de *two-hit* (HITCHINS et al. 2007; ROUNTREE et al. 2001).

2.9 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Mesmo na ausência da caracterização clínica típica, critérios devem ser utilizados para direcionar pesquisa de uma condição herdável. Nesse contexto, a determinação correta do espectro dos tumores extracolônicos na síndrome de Lynch adquire uma grande importância. Frequentemente, novas descobertas moleculares tem sido de grande valia para uma melhor definição da correlação genótipo-fenótipo e também do espectro de tumores extracolônicos na SL. Ao comparar famílias com mutações germinativas em *MLH1* ou *MSH2*, com famílias com mutações em *MSH6*, verifica-se que estas últimas apresentam um período mais tardio de início do câncer colorretal (54 contra 44) e, as mulheres deste grupo, apresentam um baixo risco de desenvolver câncer colorretal (30% aos 71 anos), porém, um alto risco de desenvolver câncer de endométrio (71% aos 71 anos) (PLASCHKE et al. 2000; HENDRIKS et al. 2004).

Outros estudos demonstram que indivíduos com mutações germinativas em *MSH2* têm um aumento no risco de desenvolver câncer no trato urinário, gástrico e de ovário quando comparado com indivíduos que apresentam mutações em *MLH1* (VASEN et al. 1996b). BECK et al. (1997) sugeriram que famílias com câncer, que não preenchiam os requisitos dos critérios de Amsterdam, mas que possuíam mutações germinativas, na maioria das vezes, apresentavam mutações do tipo *missense*, que resultavam em mudanças estruturais menos severas na proteína codificada, diminuindo a agressividade da doença.

2.10 MUTAÇÕES BIALÉLICAS NOS GENES DE REPARO DE DNA

Enquanto indivíduos com a Síndrome de Lynch, com padrão autossômico dominante, são portadores de mutações germinativas em heterozigose, há relatos na literatura descrevendo mais de 30 famílias com indivíduos sofrendo de uma nova síndrome autossômica recessiva, causada por mutações homozigóticas ou compostas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, conhecida como *Constitutional mismatch repair deficiency* (CMMR-D). Há relatos de pelo menos 10 famílias com mutações bi-alélicas em *MLH1*, três em *MSH2*, seis em *MSH6* e 11 em *PMS2* descritas na literatura (BANDIPALLIAM 2005). Diferentemente da SL, indivíduos que herdam mutações bi-alélicas, em um dos genes de reparo, não produzem proteína funcional e em geral, desenvolvem tumores hematológicos ou cerebrais já na primeira década de vida (FELTON et al. 2007). Além disso, quase todos os pacientes tem sinais semelhantes à neurofibromatose tipo 1 (NF1) em especial, manchas “café com leite” (*café au lait spots*) (WIMMER e ETZLER 2008).

Estudos sugerem que pacientes com a SL com mutações em *MSH6* frequentemente têm um atraso no aparecimento do primeiro tumor e uma penetrância incompleta quando comparados a indivíduos com mutações nos genes *MLH1* e *MSH2*, no entanto, quando mutações em homozigose ou compostas no gene *MSH6* são herdadas, o fenótipo é similar a indivíduos com deficiência constitutiva em *MLH1* e *MSH2*, onde é frequente o aparecimento de tumores gastrointestinais nas primeiras décadas de vida e

neoplasias hematológicas (MENKO et al. 2004; RIPPERGER et al. 2010; BANDIPALLIAM 2005).

2.11 OUTRAS SÍNDROMES ASSOCIADAS AO CCR NÃO POLIPOMATOSO

Mutações herdadas em outros genes também influenciam o risco de câncer colorretal. Neste contexto, a manutenção da integridade genômica, após um dano ao DNA, depende da coordenação do reparo do DNA e o do controle da progressão do ciclo celular. Desse modo, a proteína CHEK2 tem um papel crítico nas vias de sinalização ao dano no DNA (BROWN et al. 1999; CHATUVERDI et al. 1999), que é fosforilar e regular a função de BRCA1 e p53 (LEE et al. 2000). Além disso, mutações germinativas em *CHEK2* têm sido identificadas em pacientes com a Síndrome de Lynch, Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), Câncer de mama e ovário hereditário (HBOC) e Câncer de mama-cólon hereditário (HBCC) (BACHINSKI et al. 2005; WASIELEWSKI et al. 2008; SUCHY et al. 2010). Recentemente, alelos relativamente raros foram encontrados e tem sido associados ao câncer colorretal, incluindo CHEK2 1100delC, I157T, IVS2+1G>A e del5395 (SUCHY et al. 2010).

Um estudo realizado no sudeste do Brasil com famílias com câncer hereditário identificaram uma mutação fundadora, no gene *TP53*, de alta prevalência (3:1.000) , muito maior que a frequência estimada para qualquer outra mutação nesse gene (PALMERO et al. 2008). Além de sarcomas,

câncer de mama, cerebral e adrenocorticais, típicos da síndrome de Li-Fraumeni, o câncer colorretal, assim como outros tipos, foram encontrados em excesso nas famílias estudadas. Por este motivo, ACHATZ et al. (2009) propuseram que devido à alta prevalência da mutação R337H no sudeste do Brasil, famílias que apresentam critérios clínicos para qualquer das síndromes com múltiplos tumores hereditários, nas quais não foram detectadas mutações nos seus genes candidatos, tais como *BRCA1* e *BRCA2* e os genes de reparo de DNA, a avaliação dessa mutação específica deveria ser uma alternativa a ser considerada. Isso exemplifica como as síndromes de predisposição ao câncer têm espectros tumorais amplos e que se sobrepõem, tornando de grande importância o diagnóstico preciso, para um manejo adequado dos pacientes e suas famílias.

2.12 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Aconselhamento genético (AG) é o processo de comunicação da presença de uma síndrome genética aos portadores e a seus familiares. No momento do AG devem ser detalhadas informações sobre a origem, a herança e as implicações da doença, possibilitando ao paciente tomar decisões médicas e pessoais (NUSSBAUM et al. 2002).

É importante que o aconselhamento genético ocorra antes da coleta de DNA e realização dos testes, bem como no momento da divulgação dos resultados, já que a presença de uma mutação germinativa pode ter grande impacto sobre as emoções do paciente ao lidar com o destino de sua vida

em relação ao câncer. Sendo assim, este precioso conhecimento irá permitir a divulgação do risco de câncer em sítios anatômicos específicos, a idade média de início, implicações prognósticas e, possivelmente, até mesmo as escolhas quimioterápicas nos pacientes com a mutação causadora do câncer (ARNOLD et al. 2003; AEBI et al. 1996). Este conhecimento será limitado apenas pela penetrância da mutação e o impacto potencial da interação com carcinógenos ambientais (LYNCH et al. 2006).

Os pacientes devem ser esclarecidos sobre a possibilidade de realização do diagnóstico molecular da síndrome. O teste genético deve ser oferecido como confirmação do diagnóstico clínico, porém o paciente deve estar bem informado que o resultado obtido no teste não irá mudar a conduta nem o diagnóstico clínico da síndrome. Caso haja a detecção da mutação, esta poderá ser rastreada em seus familiares possibilitando a identificação de indivíduos que herdaram ou não a mutação. Os familiares que não herdarem a mutação serão liberados da intensa vigilância clínica. No entanto, caso a mutação não seja detectada pelos métodos utilizados, o paciente deve estar ciente de que outros fatores não identificados podem ocasionar a síndrome e que, mesmo sem o diagnóstico molecular, a família deverá continuar o rastreamento clínico (HEMMINKI e ENG 2004).

LYNCH et al (2006) afirmam que os aconselhadores devem estar preparados para discutir as preocupações psicológicas do paciente e, assim, abordar livremente temas como culpa, no caso em que o paciente é negativo para a mutação deletéria, ou, no caso de positivo para a mutação, preocupações com relação a discriminação no trabalho. Vigilância e

manuseio devem ser abordados, na medida em que são capazes de salvar inúmeras vidas, tudo num contexto de possível medo, ansiedade e apreensão sobre o seu destino.

Segundo LYNCH et al. (2001) O aconselhamento genético é obrigatório e deve ser dado, tanto aos pacientes quanto seus parentes, detalhes importantes sobre o risco genético, com base na história natural da síndrome de câncer hereditário, as opções de vigilância e a disponibilidade de testes genéticos. Além disso, as limitações desse conhecimento deve ser bem informadas e o aconselhamento pode ser realizado por uma discussão um a um ou em família, podendo ser fornecida a todos membros que optarem por participar. De acordo com LYNCH et al. (2001) o aconselhamento familiar, com todos indivíduos juntos, pode fornecer um grupo psicoterapêutico benéfico aos membros da família.

2.13 IMUNOISTOQUÍMICA E INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

Originalmente, a síndrome de Lynch era descrita através de um agrupamento de tumores colorretais diagnosticados através dos critérios de Amsterdam, os quais eram baseados somente em relatos familiares e pessoais de câncer. Atualmente, o uso desse critério se tornou apenas mais uma das ferramentas de diagnóstico, uma vez que os avanços no estudo da patologia dos tumores através dos testes de imunistoquímica (IHQ) e

instabilidade de microssatélites mudaram a forma de diagnóstico da síndrome de Lynch (MUELLER-KOCK et al. 2005).

As proteínas dos genes de reparo funcionam em heterodímeros, onde as “principais” proteínas, MLH1 e MSH2, são estabilizadas através de interações com outras proteínas “menores”, incluindo MSH6 e PMS2. As proteínas menores são dependentes da ligação com seus parceiros para serem expressas, desta forma, quando um tumor perde sua expressão de MSH2 há uma concomitante perda da expressão de MSH6. Similarmente, a perda de MLH1 leva a perda de PMS2. No entanto, quando há a perda de MSH6 ou PMS2, o tecido apresenta perda isolada dessas proteínas (BOLAND et al. 2008).

A imunistoquímica é aproximadamente 90% sensível, porém ela é indicada somente para mutações que causam proteínas truncadas (HAMPEL et al. 2005; HENDRIKS et al. 2006a). Em alterações do tipo *missense* a IHQ pode gerar muitos falsos positivos, pois a proteína, apesar de presente no tumor, pode estar inativa ou com atividade anormal. Além disso, ela pode estar sujeita a uma regulação fisiológica, de forma que requer experiência por parte do patologista no momento de interpretar os dados, devido a possibilidade de marcações ambíguas no tecido (BAUDHUIN et al. 2005).

A instabilidade de microssatélite, do inglês MSI, é caracterizada por inserções e deleções em pequenas repetições de 1 a 5 nucleotídeos no DNA do tumor quando comparado ao DNA do tecido normal. A detecção da instabilidade de microssatélites é uma das técnicas mais usadas em

pacientes com câncer colorretal, podendo ser encontrado em mais de 90% dos tumores colorretais da síndrome de Lynch. Pacientes com MSI apresentam, indiretamente, falhas nos genes do sistema de reparo de DNA, causando proteínas deficientes e perda do reparo no DNA (SILVA et al. 2009).

Quanto à extensão da instabilidade de microssatélites, os tumores podem ser classificados em três tipos: tumores com alta instabilidade (MSI-H), quando mais de 30% dos marcadores avaliados estiverem instáveis; baixa instabilidade (MSI-L), quando menos de 30% dos marcadores estiverem instáveis e marcadores estáveis (MSS) quando nenhum marcador estiver instável. Cerca de 10-15% dos CCR esporádicos e a grande maioria na SL apresentam o fenótipo MSI-H. Seguindo a sugestão do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos – NCI (*National Cancer Institute*), foi proposto para a SL um painel de 5 marcadores: dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250) (BOLAND et al. 1998; JENKINS et al. 2007).

A instabilidade de microssatélites é bastante sensível para a SL, mas não específica, visto que somente 20-25% de todos os tumores, com MSI-H, estão associados com mutações germinativas nos genes de reparo de DNA (LYNCH et al. 2009a). Embora o teste de MSI seja bastante sensível para a SL, ele não será detectado em cerca de 5% de todos os pacientes com mutações germinativas e sua sensibilidade não ultrapassa os 86% em pacientes com mutações no gene *MSH6* (HENDRIKS et al. 2004).

2.14 DIAGNÓSTICO DA SÍNDROME DE LYNCH

Hoje, sabe-se que a síndrome de Lynch é definida em termos da presença de mutações germinativas em um dos genes de reparo de DNA (BOLAND 2005), porém, não é padrão testar, para mutações nestes genes, qualquer paciente com câncer colorretal. A SL, muitas vezes, é difícil de ser diagnosticada, principalmente pela falta de características fenotípicas específicas. Para contornar esses problemas, o primeiro passo a ser tomado é iniciar uma minuciosa análise do histórico familiar, incluindo pelo menos três gerações avaliadas, aplicando os critérios de Amsterdam ou Bethesda. Se o diagnóstico não for comprovado pela IHQ das proteínas de reparo, o status da instabilidade de microssatélite deve ser determinado. Finalmente, o sequenciamento dos genes de reparo pode precisamente identificar mutações e facilitar o rastreamento dos membros familiares (TANYI et al. 2006).

Inúmeros avanços têm sido realizados nos últimos anos para melhor caracterização molecular da Síndrome de Lynch que, aliados a um aprimoramento contínuo dos métodos de estudo, têm fornecido uma grande variedade de alternativas para detecção de alteração nos genes associados à Síndrome de Lynch. Dessa forma, os testes genéticos para mutações germinativas nos genes de reparo de DNA, além de permitirem o diagnóstico definitivo das famílias com SL, são de grande importância para o aconselhamento, vigilância e manejo de pacientes de alto risco, visto que a

identificação de mutações pode direcionar o melhor tratamento com drogas citotóxicas e intensificar a vigilância dos pacientes através de colonoscopia.

3 OBJETIVOS

- Determinar a frequência de tumores colorretais e os tipos mais comuns de manifestações extracolônicas em famílias suspeitas de SL que preenchem exclusivamente os critérios de Amsterdam I e II.
- Determinar a frequência de mutações nos genes de reparo de DNA de menor prevalência (*MSH6*, *PMS2* e *PMS1*) em famílias suspeitas de síndrome de Lynch (critérios de Amsterdam e Bethesda).
- Determinar a frequência de mutações nos genes *TP53* e *CHEK2* em pacientes suspeitos de SL que preenchem os critérios de Amsterdam e Bethesda, mas que também podem estar associadas à síndrome de Li-Fraumeni (LFS), câncer hereditário de mama-ovário (HBOC) e síndrome de mama-cólon (HBCC).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 AMOSTRAS

4.1.1 Caracterização clínica de famílias Amsterdam

- Foram selecionadas 60 famílias não relacionadas que preenchem, exclusivamente, os critérios clínicos de Amsterdam I e II, independentemente da presença ou não de mutações nos genes de reparo de DNA. Para realizar esta análise, foi utilizado o banco de dados ONCOTREE do registro de câncer colorretal hereditário do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A C Camargo. As famílias avaliadas foram registradas entre o período de janeiro de 1998 e junho de 2009 e foram classificadas de acordo com os critérios de Amsterdam I e II. Os indivíduos e seus parentes foram entrevistados após o consentimento informado. Os seguintes critérios foram avaliados: total de número de membros, pacientes com CCR, tumores extracolônicos, gerações avaliadas e idade ao diagnóstico. O diagnóstico de tumores foi baseado em relatos verbais e em confirmações clínicas e patológicas, quando possível.

Critérios de inclusão

- Pertencer a famílias que preenchem os critérios de Amsterdam I e II da Síndrome de Lynch

Critérios de exclusão

- Incapacidade ou recusa em fornecer consentimento informado.

4.1.2 Rastreamento de mutações por sequenciamento

- Para realizar o sequenciamento dos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *CHEK2* e *TP53*, foram selecionadas 71 famílias não relacionadas, as quais apresentaram testes de mutação por sequenciamento em *MLH1* e *MSH2* negativos ou inconclusivos, recrutadas a partir do Banco de dados ONCOTREE do registro de Câncer Colorretal Hereditário do departamento de cirurgia pélvica do Hospital A.C. Camargo. Das 71 famílias avaliadas, 20 preenchem os critérios de Amsterdam e 51 preenchem os critérios de Bethesda.

Critérios de inclusão

- Pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Lynch através dos critérios de Amsterdam e Bethesda;
- Disponibilidade para coleta de sangue periférico;
- Pacientes sem mutações detectadas por sequenciamento nos genes *MLH1* e *MSH2*;

Critérios de exclusão

- Incapacidade ou recusa em fornecer consentimento informado.

4.2 ACONSELHAMENTO GENÉTICO

Todos os pacientes foram submetidos ao aconselhamento genético pré- e pós-teste, conforme o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (Anexo 1).

4.3 COLETA DE SANGUE

Os pacientes foram encaminhados para o laboratório clínico para coleta de duas amostras de sangue pela enfermeira de plantão. As amostras foram encaminhadas para banco de macromoléculas do Hospital A. C. Camargo, coordenado pela Dr. Dirce Maria Carraro, local no qual foi realizado o processo de extração do DNA.

4.4 EXTRAÇÃO DAS CÉLULAS BRANCAS DO SANGUE:

Para realizar da extração das células brancas a partir do sangue periférico dos 71 indivíduos selecionados, seguiu-se o protocolo do banco de macromoléculas do Hospital A. C. Camargo (em anexo)

4.5 EXTRAÇÃO DE DNA

As amostras de células brancas foram utilizadas para extração de DNA genômico. Foi utilizado o kit *Puregene blood Kit* (Qiagen), conforme instruções do fabricante.

4.6 DESENHO DOS PRIMERS:

Para o desenho dos iniciadores procurou-se seguir alguns critérios com a finalidade de facilitar a extensão e especificidade com os fragmentos de DNA. A composição de bases C e G dos iniciadores ficaram em torno de 50%, comprimentos de no mínimo 15 bases e temperatura média de 55°C, além de uma diferença de no máximo 2°C entre os pares de iniciadores. Para verificar a presença de estruturas secundárias (*stem loop* e *homodimer*) foi utilizado o programa OLIGOTECH versão 1.00 (Copyright© 1995), para as quais foram permitidas temperaturas de no máximo 20°C. Os iniciadores *Forward* e *Reverse* foram desenhados com o intuito de permitir a avaliação de toda a região codificadora dos genes e seus limites íntron/éxons. Todos os iniciadores foram diluídos a uma concentração estoque de 100 µM, de onde foram feitas alíquotas de trabalho na concentração de 10µM.

- O gene *MSH6* possui 10 éxons, com uma região codificadora de 4.083pb (NM_000179) no qual foram desenhados 13 pares de *primers* para sua análise.

O gene *PMS1* possui 13 éxons com uma região codificadora de 2.798pb (NM_000534) totalizando um total de 12 pares de *primers* para sua análise.

O gene *PMS2* possui 15 éxons, com uma região codificadora de 2589 pb (NM_000535), no qual foram desenhados 8 pares de *primers* para sua análise.

Para a análise do gene *CHEK2*, foram desenhados somente três pares de *primers*, onde foram analisados somente os éxons 2, 3 e 10 (NM_145862).

O gene *TP53* possui 11 éxons com uma região codificadora de 1.182pb (NM_000546), no qual foram desenhados seis pares de *primers* para sua análise.

4.7 REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

Todos os produtos de PCR amplificados foram revelados e analisados em gel de agarose 1%. Em seguida, foram tratados com 2µl de ExoSAP-IT (www.affymetrix.com) para eliminação de *primers* e Dntp's não incorporados.

4.8 PCR DE LONGO ALCANCE (*Long range PCR*)

Devido ao grande número de regiões homólogas ao gene *PMS2*, uma metodologia alternativa baseada em PCR de longo alcance, foi desenvolvida para evitar a detecção de alterações artefatuais em consequência da

amplificação dessas regiões. Foram desenhados 4 pares de *primers*, sendo o primeiro par de *primers* desenhado entre os éxons 1 a 5, formando um fragmento de 8795pb (fragmento 1); um segundo par de *primers* entre os éxons 11 e 12 de 8812pb (fragmento 2) e outro par de *primers* cobrindo do éxon 13 ao 15 com um fragmento de 7231pb (fragmento 3). Os éxons 6-10 foram amplificados individualmente (Figura 2).

Após a amplificação dos fragmentos de longa distância, Os produtos foram purificados com o kit *Agencourt AMPure XP* para limpeza de *primers* não consumidos e dNTP's, em seguida, diluídos em água. Após a purificação, os produtos de PCR foram tratados com enzimas de restrição para facilitar o sequenciamento direto.

O produto 1 foi digerido com a endonuclease de restrição *Styl* (New England Biolabs) gerando 8 fragmentos de até 1.3kb. Os produtos 2 e 3 foram tratados com a endonuclease de restrição *SmaI* gerando 7 fragmentos de até 1.5Kb e 4 fragmentos de até 3.5kb, respectivamente.

Para o sequenciamento dos fragmentos de longo alcance, foram desenhados *primers* internos para cada um dos 15 éxons do gene *PMS2*.

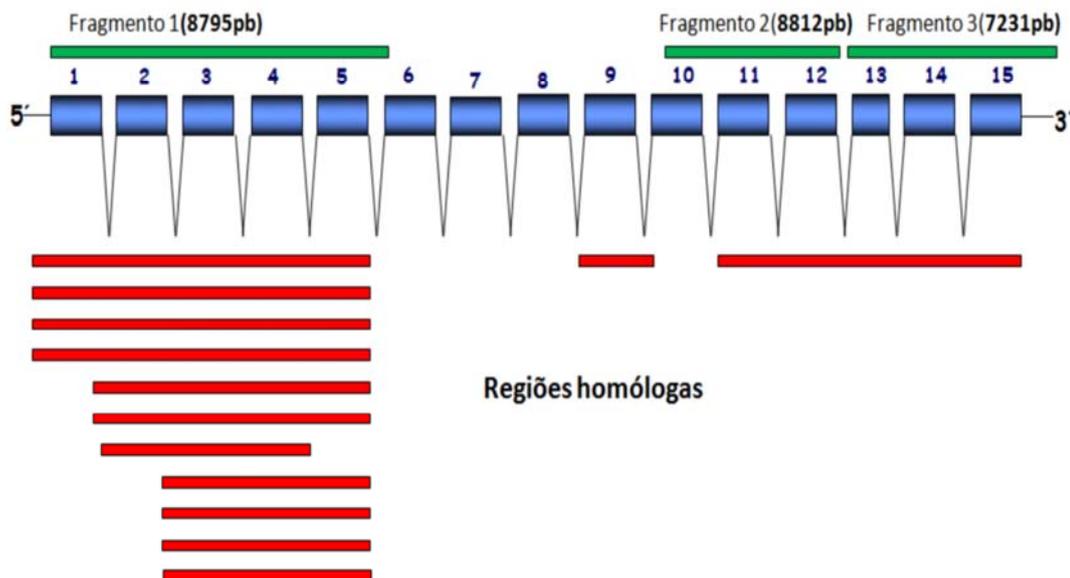


Figura 2 - Método de amplificação do gene *PMS2*, mostrando as regiões de homologia (em vermelho)

4.9 SEQUENCIAMENTO

Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 2,5 μ l do produto de PCR tratado e 0,5 μ l de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems) e um dos pares de iniciador específico para cada fragmento.

Para o método de precipitação da reação de sequenciamento foi adicionado a reação 1 μ l de EDTA 125mM e Acetado de sódio 3M, pH 5,2, além de 30 μ l de etanol 100%. Em seguida, a reação foi deixada no escuro, em temperatura ambiente, por 15 minutos para precipitação. Após a precipitação, a reação foi levada à centrifuga por 30 minutos a 4000 rpm e, em seguida, o sobrenadante foi eliminado e um rápido giro invertido na centrifuga foi adicionado para total eliminação do sobrenadante. Adicionou-se 30 μ l de etanol 70% ao produto precipitado, para lavagem e seguiu-se uma centrifugação de 40 minutos a 4000 rpm. Após procedimento supracitado, o

sobrenadante foi eliminado e a reação foi levada ao termociclador a 95°C por 20 minutos, para eliminação do etanol.

As amostras foram ressuspendidas em 15 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems), desnaturadas a 95°C em termociclador por 3 minutos e, imediatamente, acondicionadas em gelo por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático de DNA, AbiPrism 3130XL da Applied Biosystems.

4.10 AMOSTRA REFERÊNCIA

O banco de dados do NCBI foi utilizado como referência para identificação das mutações encontradas. As sequências da região codificante de cada um dos genes foram obtidas do banco de nucleotídeos do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/guide/>). A saber:

MSH6: NM_000179

PMS1: NM_000534

PMS2: NM_000535

CHEK2: NM_145862

TP53: NM_000546

A avaliação dos resultados foi realizada utilizando o Software CLCbio Main Workbench.

4.11 DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES ENCONTRADAS

A nomenclatura utilizada para as mutações encontradas é baseada no trabalho proposto por DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000).

4.12 INTERPRETAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO TIPO *MISSENSE* JÁ DESCRITAS

Para a interpretação e determinação da significância patogênica das mutações encontradas, foram consultadas as seguintes bases de dados:

- ✓ Leiden Open Variation Database (LOVD) (http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php)
- ✓ *MMR Gene Unclassified Variants Database* (www.mmruv.info)
- ✓ Mismatch Repair Genes Variant Database (<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>)
- ✓ The Human Gene Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)
- ✓ IARC TP53 Database (<http://www-p53.iarc.fr/>)

4.13 INTERPRETAÇÃO DAS ALTERAÇÕES DO TIPO *MISSENSE* NÃO DESCRITAS

Para as mutações do tipo *missense* foram utilizados dois algoritmos complementares para a predição de sua patogenicidade. Os algoritmos e os critérios utilizados estão descritos a seguir:

- POLYPHEN (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)
- SIFT (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_BLink_submit.html)

Os valores do SIFT são de 0 a 1, escores $\leq 0,05$ foram considerados como “Affect protein function” (afeta a função protéica), enquanto escores $\geq 0,05$ foram consideradas como “tolerante”, seguindo as recomendações do programa (NG e HENIKOFF 2001).

Os valores do POLYPHEN são de 0 a 3.37, escores >2.0 foram considerados como “provavelmente prejudicial”, enquanto escores de 1.50-1.99 indicaram que a variante poderia ser “possivelmente prejudicial” e os escores de 0 a 1.49 como “benignos”, seguindo as recomendações do programa (RAMENSKY et al. 2002)

Critério de classificação de acordo com a análise *in silico*

Patogênica: Quando ambos os algoritmos concordam em afirmar que se trata de uma alteração patogênica (SIFT:“afeta a função proteica” - Polyphen:“possivelmente ou provavelmente prejudicial”).

Inconclusiva: Quando os algoritmos apresentarem resultados conflitantes.

Não patogênica: Quando ambos os algoritmos concordam em afirmar que se trata de uma alteração não patogênica (SIFT: Tolerada - Polyphen: Benigna).

4.14 FLUXO DE RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES

O presente trabalho faz parte de um grande estudo que inclui o rastreamento genético dos genes *BRCA1* e *BRCA2* em pacientes com câncer de mama-ovário hereditário (HBOC) e o rastreamento genético dos principais genes de reparo de DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*) relacionados à síndrome de Lynch (SL). Para o rastreamento de mutações na SL, foram incluídos 101 indivíduos não relacionados que preenchem os critérios de suspeita para síndrome de Lynch (Amsterdam I, II e Bethesda). A avaliação se iniciou a partir dos dois principais genes de reparo de DNA, *MLH1* e *MSH2*, onde DOMINGUEZ (2008) detectou 30 mutações patogênicas nos genes, *MLH1* (15) e *MSH2* (15).

Para este estudo, não foram levados em consideração os dados de imunohistoquímica referentes aos genes de reparo de DNA. Dessa forma, foi

proposto um fluxo de trabalho, onde o primeiro gene a ser analisado seria o *MSH6* por ser, após os genes *MLH1* e *MSH2*, o gene de maior frequência de envolvimento da Síndrome de Lynch (~10%), quando comparado aos genes *PMS2* e *PMS1* (~5%) (WOODS et al. 2005; WALSH et al. 2009). Numa segunda etapa do rastreamento, foram analisados os genes *PMS1* e *PMS2*, concomitantemente. Em uma última análise, seguimos para o rastreamento parcial do gene *CHEK2*, seguido por *TP53* (Figura 2).

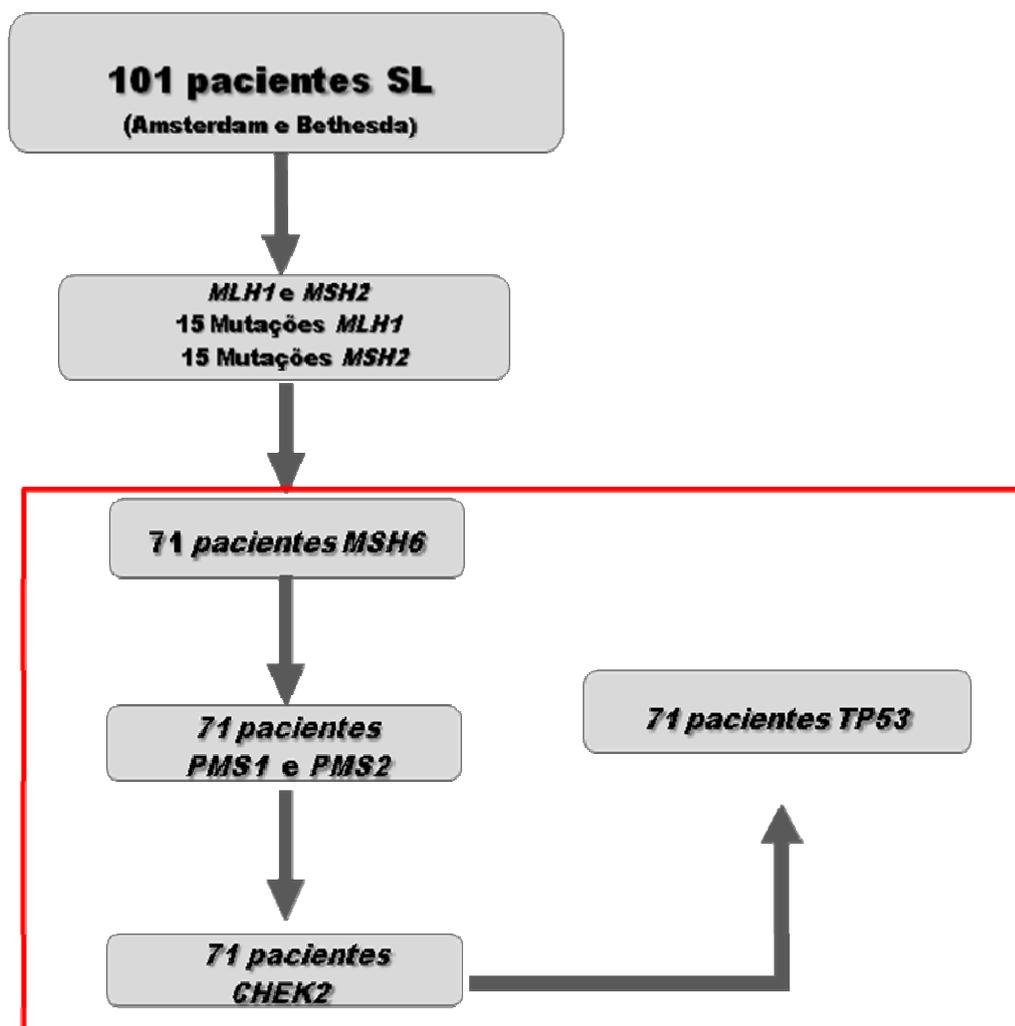


Figura 3 - Fluxograma do projeto de rastreamento de mutações em famílias com a síndrome de Lynch. A parte descrita nesta tese está destacada em vermelho.

5 RESULTADOS & DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DE FAMÍLIAS AMSTERDAM

A partir das 60 famílias não relacionadas que preenchem os critérios clínicos de Amsterdam, foram avaliados 1040 homens e 1055 mulheres (total de 2095). Dessas 60 famílias, 53 preenchem o critério de Amsterdam I e sete preenchem o critério de Amsterdam II (Tabela 2). O número de indivíduos em cada família variou de cinco a 139 (média de 35, mediana de 30), onde foram avaliadas seis gerações em uma família (1,6%), cinco gerações em 19 famílias (31,6%), quatro gerações em 33 famílias (55%), três gerações em seis famílias (10%) e duas gerações em uma família (1,6%).

Como esperado, o câncer colorretal foi o tipo de tumor mais frequente nas famílias, no qual foram identificados 334 indivíduos (334/2095), dos quais revelaram 361 tumores colorretais, representando uma frequência de 16% de indivíduos afetados. No total, foram identificados 482 indivíduos com câncer (23%), revelando 561 tumores colorretais e extracolônicos (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das famílias e tipos de tumores de acordo com os critérios de Amsterdam.

N°	Critérios			
	Amsterdam I		Amsterdam II	
Famílias (N=60)	53		7	
Indivíduos (N=2095)	Homens	Mulheres	Homens	Mulheres
	905	939	135	116
Tumores				
CCR (N=361)	157	166	14	24
Extracolônicos (N=200)	61	94*	16	29*

*p<0,05

Nessas 60 famílias, os tumores extracolônicos foram mais frequentes em mulheres (123 casos) que em homens (77). Pelo teste de qui-quadrado, as mulheres apresentaram uma diferença significativa para a presença de tumores extracolônicos, quando comparadas aos homens. O teste foi aplicado em ambos os critérios e foi estatisticamente significativo entre os gêneros.

A idade de diagnóstico foi documentada em 76,3% (428/561) de todos os tumores, variando de nove a 93 anos de idade. A média de idade do primeiro tumor primário foi de 46 anos (mediana de 46). Sessenta e sete pacientes tiveram mais de um tumor, dos quais 53 tiveram dois tumores, 10 deles tiveram três tumores e quatro pacientes tiveram quatro tumores.

A Figura 4 mostra que o tumor extracolônico mais frequente em homens foi próstata (16 casos), seguido de câncer gástrico (12 casos), câncer do trato hepatobiliar, pâncreas, pulmão, pele e cérebro (4 casos) ,

ureter e p elvis renal (3 casos), intestino delgado (1 caso) e outros sítios primários incluindo sítios não especificados (10 casos).

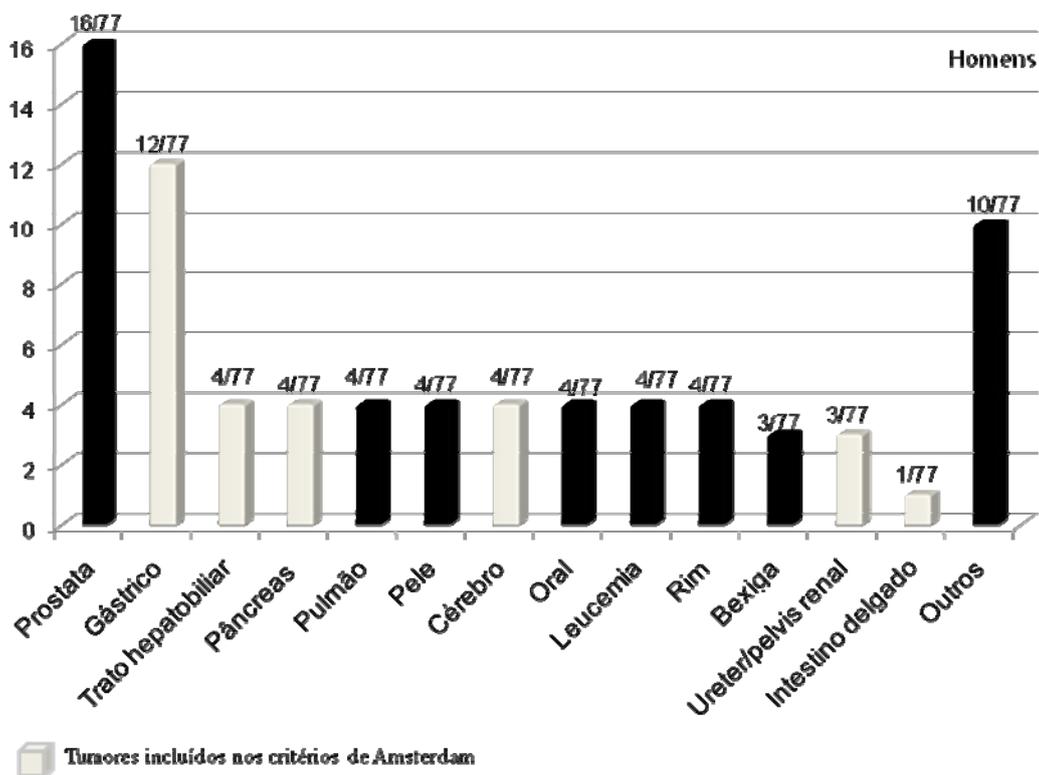


Figura 4 - Frequência de tumores extracolônicos nas 60 famílias (homens).

Em mulheres, o sítio primário mais frequente foi mama com 32 casos, seguido de câncer cervical (20 casos), endométrio (20 casos), gástrico (12 casos), ovário, oral e leucemia (4 casos), ureter/p elvis renal, intestino delgado e cérebro (3 casos), pele e sebáceo (2 casos), além de 16 casos em outros sítios, incluindo localiza o não especificada (Figura 5).

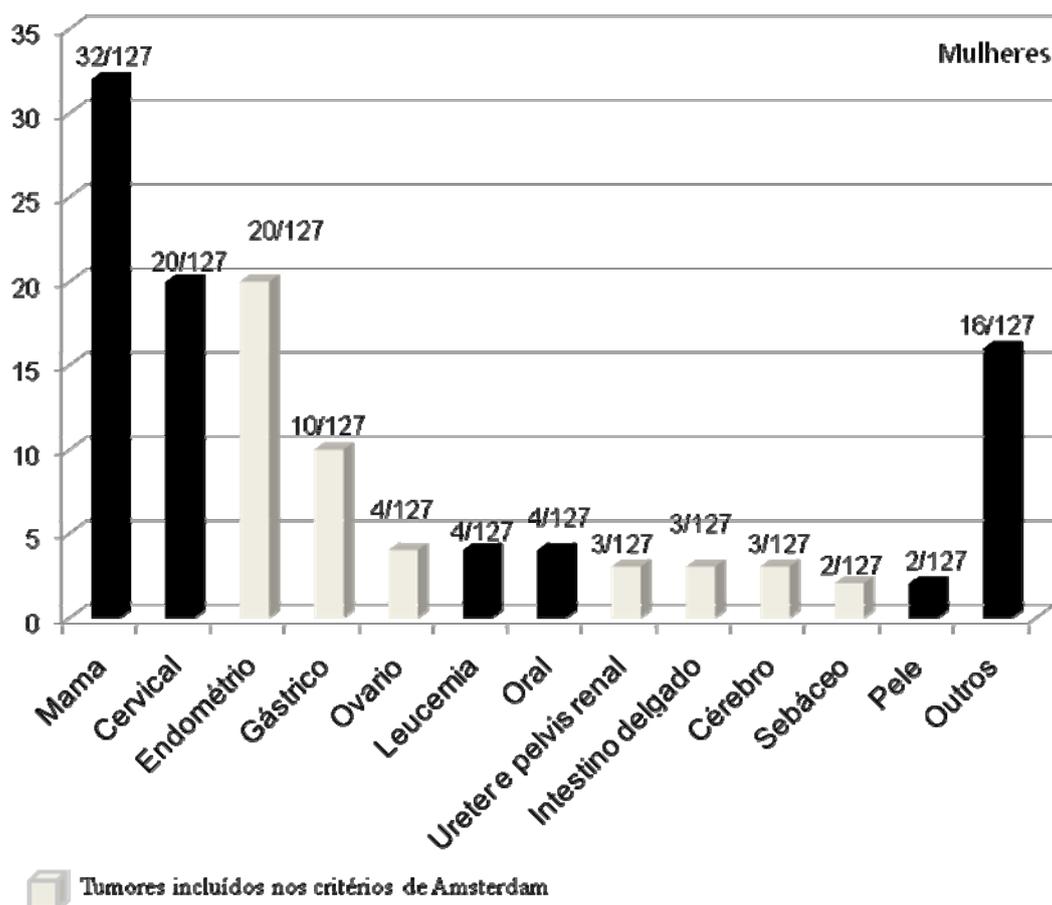


Figura 5 - Frequência de tumores extracolônicos nas 60 famílias (mulheres).

No Brasil, as taxas de incidência para o câncer de mama são de 49 indivíduos para cada 100.000 habitantes (Ministério da Saúde 2009), porém, nessas famílias, as taxas tiveram um crescimento considerável, chegando a 3.408/100.000. Além disso, a média de idade de diagnóstico foi de 42 anos (25-84), o qual significa uma antecipação de quase 20 anos quando comparado à população geral (HENDERSON et al. 2010). Embora o câncer de mama não seja considerado como parte do espectro de tumores da síndrome, vários estudos tem encontrado uma alta incidência de câncer de mama entre os familiares (NELSON et al. 1993; RISINGER et al. 1996;

BOYD et al. 1999; VASEN et al. 2001a; DE LEEUW et al 2003; WESTENEND et al. 2005), no qual defeitos no sistema de reparo têm sido descritos num grande número de pacientes com câncer de mama, sugerindo seu possível envolvimento no espectro de tumores da SL (OLIVEIRA FERREIRA et al. 2004).

Embora estudos envolvendo o papel dos genes de reparo na tumorigênese mamária cheguem a diferentes conclusões a respeito de sua ligação com a síndrome de Lynch (ITOH et al. 1990; WATSON e LYNCH et al. 1993; AARNIO et al. 1999; SCOTT et al. 2001; MULLER et al. 2002; WESTENEND et al. 2005), recentemente, JENSEN et al. (2010) estudaram 164 famílias dinamarquesas com mutações patogênicas nos genes de reparo e identificaram 20 portadores afetados com câncer de mama em idade média de 51 anos. Eles encontraram perda da expressão protéica dos genes de reparo em 43% dos pacientes com câncer de mama (7/16), demonstrando que os genes de reparo têm um papel numa considerável porção de casos. De acordo com os autores, reações linfocitárias, característica comum do câncer colorretal (JASS 2000), poderia representar um potencial marcador de dano ao sistema de reparo em câncer de mama em indivíduos com a síndrome de Lynch.

Não se pode descartar a possibilidade dos achados deste estudo estarem relacionados a outras síndromes de predisposição ao câncer colorretal. MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) publicaram um estudo com famílias com câncer colorretal e de mama, os quais foram testados para os genes *BRCA1*, *BRCA2* e os genes de reparo de DNA. Um grupo de

pacientes sem mutações, mas que apresentavam um fenótipo para a síndrome de mama-cólon (HBC), tiveram um aumento significativo na incidência da mutação CHEK2 1100delC (18%) quando comparados com famílias sem casos de câncer de mama e colorretal. Esses achados sugeriram uma associação entre a mutação CHEK2 1100delC em famílias com a Síndrome de Lynch. Além disso, existe a possibilidade de estar ocorrendo uma sobreposição entre as síndromes de câncer de mama-ovário e Lynch, devido ao fato de algumas dessas famílias incluídas no estudo, preencherem ambos os critérios, criando um fator que poderia afetar a correta interpretação.

Mulheres com a Síndrome de Lynch têm um risco de 24-62% de desenvolver câncer de endométrio aos 70 anos (AARNIO et al. 1995; SCOTT et al. 2001; VASEN et al. 2001b; WATSON e LYNCH 2001; PARC et al. 2003) e, em concordância com nosso estudo, câncer de endométrio foi o segundo tipo mais comum, assim como o câncer cervical. Pelo fato do heredograma das famílias serem baseado, principalmente, no relato verbal do probando, a diferenciação entre endométrio e cérvix pode gerar erros de interpretação, de forma que o correto número de tumores endometriais pode ser maior que o imaginado. Além disso, esta alta frequência de tumores pode ser justificada pelo recente estudo que mostra que até 1,6% de todos os casos de câncer endometrial estão relacionados com mutações no gene *MSH6* (GOODFELLOW et al. 2003). Visto que mutações no gene *MSH6* são responsáveis por aproximadamente 10% dos casos de SL. (WAGNER et al.

2003), os autores afirmam que o total de casos de câncer de endométrio associado à síndrome de Lynch é consideravelmente subestimado.

A maior incidência de mulheres com tumores extracolônicos quando comparada aos homens, é realçada pela alta frequência de tumores de endométrio nas famílias. Além disso, apesar do câncer de mama ter uma taxa de incidência semelhante ao câncer de próstata, a frequência do câncer de mama foi muito mais alta quando comparada ao câncer de próstata, o que contribuiu bastante para elevar a incidência de manifestações extracolônicas em mulheres.

O câncer cervical é o segundo tipo de tumor mais comum no mundo todo. A presença de vários genótipos de HPV (*Human papilloma virus*), o comportamento sexual e o perfil socioeconômico da população, representam um dos maiores riscos para o desenvolvimento desse tipo de carcinoma. Vários estudos encontraram uma associação direta da infecção por HPV com o número de parceiros sexuais ao longo da vida (FRANCO et al. 1995; KJAER et al. 2001; PEYTON et al. 2001). Em geral, temos visto um padrão de mudanças no comportamento sexual ao longo do tempo, principalmente entre os países ocidentais, onde são vários os relatos de uma iniciação sexual mais precoce ou uma diminuição do intervalo entre a menarca e iniciação sexual, os quais são importantes fatores de risco para infecção por HPV. Além disso, o número de parceiros sexuais ao longo da vida aumenta a probabilidade de infecção por HPV, e conseqüentemente, uma maior incidência de câncer de colo do útero nesse grupo (BURCHELL et al. 2006). No Brasil, o câncer de colo do útero é o segundo tumor mais frequente na

população e apesar de o Brasil ser um país em franco processo de desenvolvimento, ele ainda é caracterizado por uma grande discrepância cultural e socioeconômica, fazendo com que essa alta frequência de tumores de colo do útero seja pouco provável de estar relacionada à síndrome de Lynch.

Sabe-se que a incidência de câncer gástrico varia bastante em diferentes regiões, sendo relativamente mais alta no Japão, China, Coréia e América Latina. Existem duas variantes histológicas principais de câncer gástrico: o tipo intestinal e o tipo difuso (LYNCH et al. 2005). O tipo difuso tem sido relacionado a alterações no gene *CDH1*, responsável pelo câncer gástrico difuso hereditário (BEVAN e HOULSTON 1999), enquanto que o tipo intestinal é o mais frequentemente encontrado na população geral e comumente relacionado a exposições ambientais, as quais incluem uma dieta rica em carne vermelha, defumados, fumo, consumo de bebidas alcoólicas e infecção por *H. pylori*.

No entanto, GYLLING et al. (2007) conduziram um estudo com 13 pacientes da SL com câncer gástrico, demonstrando que a idade média de diagnóstico desses pacientes foi de 58 anos contra 76 nos casos esporádicos. Além disso, 92% dos tumores tinham a histologia intestinal, instabilidade de microssatélites alta, ausência de pelo menos uma das proteínas de reparo, frequente perda de heterozigose do gene *APC* (*APC-LOH*) e um grande número de outros eventos típicos da deficiência das proteínas de reparo de DNA. A taxa estimada para a população brasileira é de 14/100.000 para homens e de 7/100.000 em mulheres (Ministério da

Saúde 2009) e analisando essas 60 famílias as taxas chegariam a mais de 1.000/100.000 para ambos os sexos, onde a idade média de diagnóstico foi de 53 anos. Apesar do elevado risco nessas famílias, o câncer gástrico é muito frequente na população geral brasileira, de forma que sua real associação com a síndrome de Lynch permanece incerta e futuras análises, tais como a avaliação de instabilidade de microssatélites e perda de heterozigose dos genes de reparo no tumor gástrico, serão necessárias para determinar seu envolvimento na SL.

O câncer de próstata, na maioria dos casos dessa série, foi diagnosticado acima dos 70 anos de idade e por ser o tumor mais frequente na população brasileira, seu envolvimento com a SL se torna bastante improvável e acredita-se que esteja muito mais associado à exposição ambiental do que qualquer outro fator hereditário relacionado à Síndrome de Lynch.

5.2 RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES POR SEQUENCIAMENTO

Num estudo recente realizado pelo nosso grupo no Hospital A. C. Camargo, foram recrutadas 101 famílias não relacionadas que preenchiam os critérios clínicos da síndrome de Lynch (Amsterdam I, II e Bethesda) para uma avaliação que se iniciou com a análise de imunohistoquímica (IHQ) nos genes de reparo de DNA na peça tumoral, seguida pela avaliação de instabilidade de microssatélites (OLIVEIRA 2008) que foram realizadas concomitantemente (não hierarquicamente) com o rastreamento de

mutações por sequenciamento nos principais genes de reparo de DNA (*MLH1* e *MSH2*) (DOMINGUEZ 2009). Nesse estudo, foram detectadas 30 famílias com mutações patogênicas, deixando 71 famílias com resultados inconclusivos ou sem mutações patogênicas nos genes *MLH1* e *MSH2*.

Essas 71 famílias não relacionadas, sem alterações nos genes *MLH1* e *MSH2*, foram selecionadas para serem avaliadas para mutações nos genes *MSH6*, *PMS2*, *PMS1*, *CHEK2* e *TP53*. Das 71 famílias, 20 preenchem os critérios de Amsterdam e 51 preenchem aos critérios de Bethesda. A casuística foi composta de 49 pacientes do sexo feminino e 22 do sexo masculino. Nos probandos de famílias Amsterdam o tumor de cólon ocorreu em 17 casos, seguido de dois casos de tumor de reto e sete casos de tumores extracolônicos. Nos 51 probandos de famílias Bethesda, o câncer de cólon foi encontrado em 34 casos, seguido de reto em nove casos, além de quatro tumores extracolônicos (Tabela 2).

Tabela 2 - Critérios clínicos e tipo de tumores nos 71 indivíduos com a síndrome de Lynch.

	Amsterdam	Bethesda
Nº de famílias	20	51
Média de idade	46.6	41.7
Localização do tumor:		
<i>Cólon</i>	17	34
<i>Reto</i>	2	9
<i>Extracolônicos:</i>		
<i>Mama</i>	3	-
<i>Endométrio</i>	1	1
<i>Intestino delgado</i>	1	1
<i>Outros</i>	2	2

5.2.1 Gene *MSH6*

Dos 71 pacientes avaliados, foram identificadas sete novas alterações e mais duas alterações já descritas nos bancos de dados no gene *MSH6* (Tabela 3).

Tabela 3 - Características clínicas e análise *in silico* das alterações detectadas no gene *MSH6*.

<i>MSH6</i>	Alteração	Cancer (idade)	Critério clínico	SIFT	Polyphen	Classificação
Família						
SL-2-13	p.Glu1163X	Cólon (39)	BG	-	-	Patogênica
SL-030	p.Lys1325del	Cólon (41), Pulmão (44)	BG	-	-	Patogênica
SL-047	p.Ala794HisfsX9	Endométrio (49), Mama (64) Pâncreas (69), Cólon (70)	ACII	-	-	Patogênica
SL-069	p.Pro42Ser	Cólon (36)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica
SL-069	p.Glu446Asp			Tol.	Possiv.	Inconclusiva
SL-069	p.Arg644Ser			Tol.	Ben.	Não Patogênica
SL-078	p.Arg1304Lys	Cólon (28)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica
SL-061	p.Ser144Ile	Cólon (56)	AM	Tol.	Possiv	Inconclusiva
SL-060	p.Val878Ala	Cólon (39)	BG	Tol.	Possiv.	Inconclusiva
SL-088	p.Val878Ala	Linfoma (33)	BG	Tol.	Possiv.	Inconclusiva

Tol. : Tolerante; Ben.:Benigna; ACII: Critério de Amsterdam II; BG: Critério de Bethesda

- **Alterações Patogênicas no gene *MSH6***

Paciente SL-030

O paciente SL-030 foi incluído no estudo com a suspeita de síndrome de Lynch a partir dos critérios de Bethesda, pois havia tido o diagnóstico de um tumor de cólon aos 41 anos de idade e somente uma irmã com colangiocarcinoma aos 44 anos de idade e uma prima com câncer de mama bilateral.

Numa primeira análise, foi realizada a avaliação das proteínas de reparo de DNA, com o intuito de detectar alguma alteração que pudesse levar a uma confirmação da síndrome de Lynch. Os resultados não apresentaram a perda de expressão do dímero MLH1-PMS2, porém a análise do dímero MSH2-MSH6 mostrou expressão preservada de MSH2, mas um resultado inconclusivo para a proteína MSH6, onde se observava alternância de focos de expressão e perda da proteína na região tumoral (OLIVEIRA 2008).

A partir dessa informação, foi realizado o sequenciamento direto, técnica padrão ouro para detectar mutações pontuais e pequenas inserções e deleções, dos três principais genes de reparo de DNA (*MLH1*, *MSH2* e *MSH6*), que juntos representam mais de 90% das mutações detectadas na SL. Não foram detectadas alterações através da técnica de sequenciamento nos genes *MLH1* e *MSH2*. Porém, quando foi realizada a análise do gene *MSH6* verificou-se uma deleção *in-frame* de três pares de bases no penúltimo éxons (éxons 9) do gene (c.3974_3976del) (Figura 6).

Interessantemente, esta deleção c.3974_3976del, foi detectada nas duas cópias dos cromossomos homólogos (homozigose) que levou a perda de somente um aminoácido de Lisina na sequência da proteína. Para determinar a origem dessa mutação em homozigose, o primeiro passo foi verificar a possibilidade de casamento consanguíneo dentro da família, de forma que uma cópia de cada alelo mutado seria proveniente de pais aparentados. A análise do heredograma da família não revelou parentesco entre seus progenitores, os quais já haviam falecido no momento de sua

aceitação no estudo, impossibilitando determinar se os dois progenitores eram portadores da alteração ou pelo menos um deles.

Recentemente, foi descrita uma nova síndrome de herança recessiva chamada de Deficiência constitucional dos genes de reparo de DNA (CMMR-D), com vários estudos relatando pacientes com mutações bialélicas nos genes de reparo. Em geral, há uma tendência de que a idade de aparecimento do tumor esteja relacionada com a severidade da mutação dos genes de MMR herdada, na qual alelos herdados, que causam um grande comprometimento da função dos genes de reparo, resultam em tumores hematológicos e cerebrais já na primeira década de vida, enquanto que uma deficiência parcial ou incompleta nos indivíduos tende a desenvolver tumores hematológicos, cerebrais e gastrointestinais entre a segunda e quarta década de vida (FELTON et al. 2007; WIMMER e ETZLER 2008).

A grande maioria dos relatos de pacientes com CMMR-D surgiu de casos com múltiplos tumores, provenientes de casamentos consanguíneos com um claro histórico de SL ou devido a ocorrência de tumores associados a síndrome de Lynch já nas duas primeiras décadas de vida. Curiosamente, o paciente SL-030 não se encaixava em nenhuma das características típicas da síndrome CMMR-D, tais como tumores hematológicos ou cerebral na primeira década de vida, manchas *café au lait* ou ainda características típicas de neurofibromatose tipo 1 (RIPPERGER et al. 2010).

Diante de um caso bastante atípico, voltamos às análises para os genes *MLH1* e *MSH2* para excluir a possibilidade de ter ocorrido algum rearranjo nesses genes, os quais representam cerca de 20% de todas as

alterações já descritas na SL. Para esta avaliação, foi realizada a técnica de MLPA e não foi detectada nenhuma alteração nesses dois genes.

Com esta informação, nós concentramos numa minuciosa análise de toda a sequência do gene *MSH6*, onde foi confirmada a deleção em homozigose. Com a informação obtida pelo sequenciamento de todo o gene, verificou-se que o paciente possuía outros quatro polimorfismos em homozigose, distribuídos ao longo dos éxons. Diante desses achados, cogitou-se a possibilidade de não termos detectado uma grande deleção capaz de causar a completa perda de um dos alelos do gene *MSH6*.

A melhor técnica para a busca de rearranjos cromossômicos seria o kit de MLPA específico para o gene *MSH6*, porém, baseados na possibilidade da existência de uma deleção em toda a região do gene, observada pela ausência de regiões polimórficas ao longo do gene, optamos por realizar o estudo da variação do número de cópias, através da técnica de CGH-array que permite detectar de pequenas a grandes deleções em todo o genoma. Entretanto, os resultados não evidenciaram qualquer alteração nos genes relacionados com o reparo do DNA. Porém, foi detectada uma grande perda genômica, de cerca de 170Kb que englobavam os genes *SGSM1* e *TMEM211* que até o momento não haviam sido relatados na população geral (Figura 6).

Um recente estudo realizado por YANG et al. (2007) verificou que a proteína *SGSM1* é expressa numa grande variedade de tecidos, mas principalmente no cérebro, coração e testículos. Segundo os autores, essa proteína tem um papel de modulador das proteínas RAP e RAB,

principalmente na transdução de sinais e transporte de vesículas no cérebro. Porém, a família das proteínas RAP tem papel chave na adesão celular e na via de sinalização WNT/ β -catenina, que são processos fundamentais e constantemente alterados na carcinogênese colorretal (SHIMIZU et al. 2002). Diante disso, não podemos excluir a possibilidade do envolvimento dessa grande deleção na carcinogênese desse paciente, de forma que análises adicionais são necessárias para melhor entender o processo.

Diante desses achados, podemos especular que o paciente SL-030 possa ter sofrido um processo de conversão gênica durante a meiose, na qual não ocorre uma transferência recíproca da informação genética, ficando com o alelo mutado nos dois cromossomos homólogos. Porém, uma futura análise com vários marcadores moleculares podem ajudar a determinar esse possível processo de conversão gênica.

Em resumo, verificamos a possibilidade do paciente SL-030 pertencer a uma nova síndrome relacionada à SL, caracterizada por mutações bialélicas em um dos genes de reparo de DNA e, embora não seja uma regra, parece verdadeira a afirmação de que mutações menos severas, com potencial de manter uma atividade residual, são capazes de influenciar no início do aparecimento do primeiro tumor. Além disso, outros fatores ambientais e genéticos podem contribuir para a variabilidade em termos de espectro de tumores e idade de surgimento.

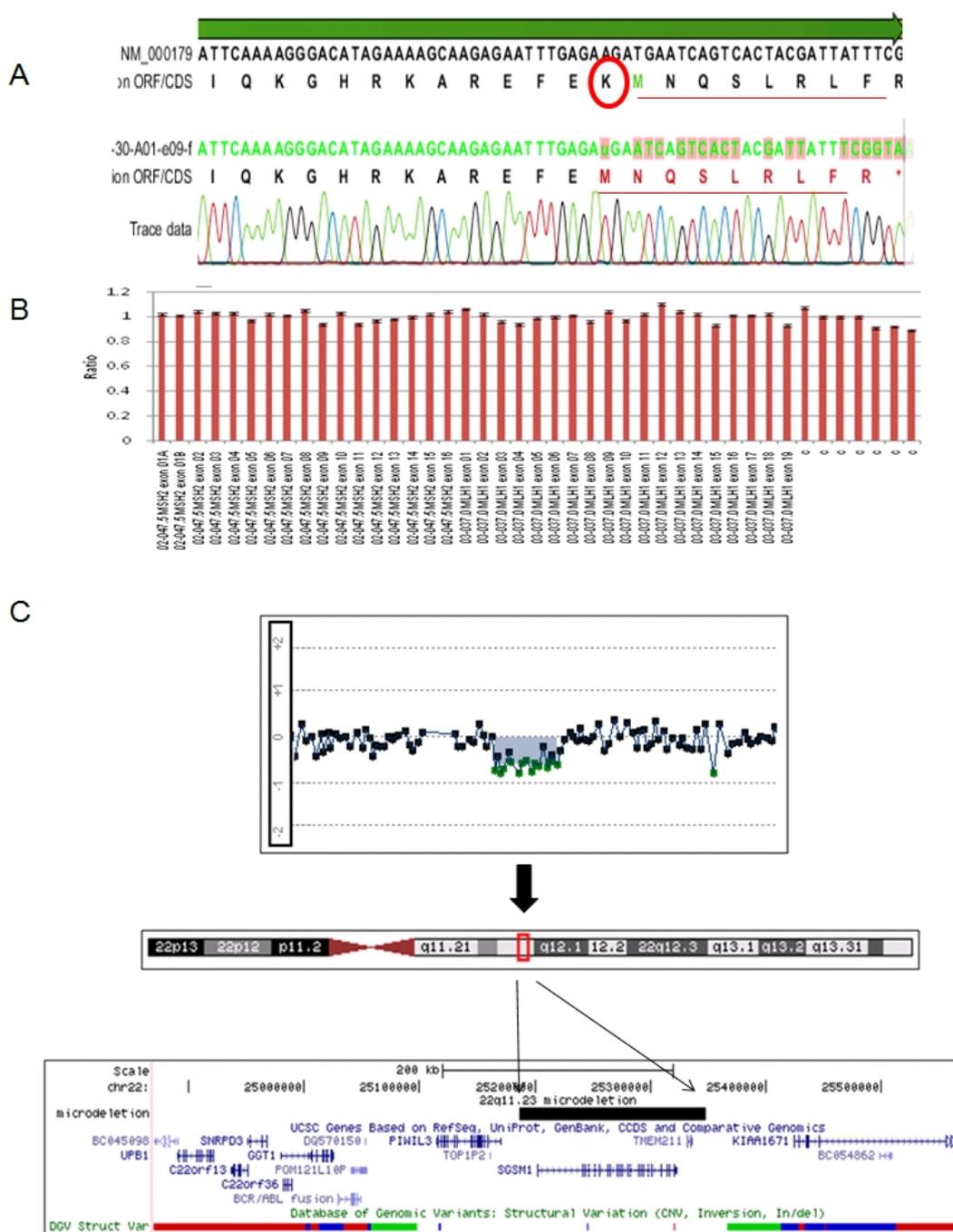


Figura 6 - Perfil de sequenciamento, MLPA e CGH-Array no paciente SL-030. (A) Eletroferograma do gene *MSH6* mostrando a deleção do aminoácido Lisina (K). (B) Perfil do MLPA para os genes *MLH1* e *MSH2*. (C) Perfil do CGH-Array na região do cromossomo 22, mostrando a deleção em heterozigose, no contexto da região genômica mapeada no GRCh37 (hg19) (barra preta). A microdeleção abrange os genes *SGSM1* e *TMEN211*.

Paciente SL-047

A paciente SL-047 foi encaminhada ao departamento, devido seu longo histórico pessoal de câncer, com um tumor de endométrio aos 49 anos, seguido de tumor de mama aos 64, pâncreas aos 69 e adenomas aos 70. A paciente relatou um longo histórico familiar de câncer, onde se constatou a caracterização clínica da Síndrome de Lynch através dos critérios de Amsterdam II, pela alta incidência de tumores extracolônicos relacionados à síndrome.

A análise do sequenciamento dos genes de reparo revelou uma mutação patogênica do tipo *frameshift*, devido a deleção de um par de nucleotídeos (TG) no éxon 4 do gene *MSH6* (c.2379_2380del), causando uma alteração na sequência de leitura da proteína, com a formação de um códon prematuro de parada a nove aminoácidos após a deleção (p.Ala794HisfsX9). Os dados obtidos com o sequenciamento foram compatíveis com os resultados de imunoistoquímica que havia demonstrado a perda da expressão protéica do dímero MSH2-MSH6 (OLIVEIRA 2008).

Paciente SL-2-13

O paciente SL-2-13 apresentou uma nova mutação do tipo *nonsense* (c.3487G>T; p.Glu1163X), caracterizada pela formação de um códon prematuro de parada no éxon 6 do gene *MSH6*. Este paciente não possuía histórico familiar de câncer e foi diagnosticado com um tumor de cólon aos 39 anos.

- **Alterações de significado desconhecido no gene *MSH6***

Paciente SL-069

O paciente SL-069 foi diagnosticado com um tumor de cólon aos 36 anos de idade e a análise do gene *MSH6* revelou três novas alterações do tipo *missense*, a primeira foi localizada no éxon 1 (c.124C>T), a segunda foi localizada no éxon 4 (c.1932G>C), e uma terceira, localizada no éxon 4 (c.1338A>T). A análise *in silico* das alterações, através dos programas Polyphen e SIFT, classificou as duas primeiras como benignas, enquanto que a terceira alteração foi classificada com inconclusiva (Tabela 4).

- **Alterações já descritas no gene *MSH6***

Paciente SL-061

O paciente SL-061 teve um tumor de cólon aos 56 anos de idade sem histórico familiar de câncer (critério de Bethesda) e apresentou uma alteração no éxon 2 (c.431G>T), já descrita nos bancos de dados 21 vezes. Os resultados dessa alteração na literatura são bastante conflitantes, onde estudos anteriores identificaram essa alteração em famílias não relacionadas com a SL, que não haviam sido detectadas em 400 indivíduos controles (KOLODNER et al. 1999b; WU et al. 1999; BERENDS et al. 2002), fornecendo uma forte evidência genética de que essa variante seria relevante para a doença. Além disso, os tumores com essa alteração apresentavam instabilidade de microssatélites, sugerindo que essa mutação,

de alguma forma, estaria afetando o sistema de reparo, independentemente da ausência de defeitos bioquímicos *in vitro*.

Estudos mais recentes verificaram que essa alteração se mostrou proficiente numa série de avaliações que incluíam a análise de sua expressão, capacidade de reparo, ligação ao DNA e ligação ao MSH2 (CYR e HEINEN 2008; KARIOLA et al. 2002). Nesse estudo, essa alteração foi classificada como inconclusiva, por apresentar resultados conflitantes na análise *in silico* (Tabela 4).

Pacientes SL-060 e SL-088

Os pacientes SL-060 e SL-088 preencheram os critérios de Bethesda e ambos apresentaram uma mesma alteração no éxon 4 (c.2633T>C). A idade de diagnóstico do tumor de cólon do paciente SL-060 foi de 39 anos. O Paciente SL-088 teve um linfoma aos 33 anos e um adenoma com displasia de alto grau com a mesma idade. Essa alteração foi descrita 40 vezes no banco de dados LOVD e sua associação com a SL ainda não está bem esclarecida, com resultados conflitantes na literatura (CYR e HEINEN 2008). Nesse estudo, essa alteração foi classificada como inconclusiva.

Mutações germinativas relacionadas com a síndrome de Lynch são, na grande maioria dos casos, mutações truncadas que causam perda da expressão protéica, porém para o gene *MSH6*, mutações do tipo *missense* são bastante comuns (PELTOMAKI e VASEN 2004). Mutações *missense* nem sempre são claras, como podemos ilustrar o caso da alteração c.2633T>C detectada em duas famílias desse estudo, onde vários estudos

reportam a mutação como patogênica e outros como uma variante sem significância clínica (WIJNEN et al. 1999; CHARAMES et al. 2000; BERENDS et al. 2002; PETERLONGO et al. 2003; CALDES et al. 2004; PLASCHKE et al. 2004). A patogenicidade de algumas alterações *missense* no gene *MSH6* já foi testada através de análises funcionais, sugerindo algumas como patogênicas, porém, deixando muitas outras não resolvidas (KOLODNER et al. 1999b; KARIOLA et al. 2002; KARIOLA et al. 2003). Algumas alterações *missense* são descritas segregando em famílias suspeitas para a SL (KARIOLA et al. 2004) e algumas são relatadas como patogênicas baseadas na presença de instabilidade de microssatélites e perda isolada da proteína MSH6. Os critérios mais importantes para suportar a patogenicidade, no contexto da síndrome de Lynch, são: a conservação evolucionária do aminoácido envolvido, a mudança na polaridade, a ausência da variante na população normal, a sua segregação com a família e associação com instabilidade de microssatélites e a falta de expressão protéica no tecido tumoral (NIESSEN et al. 2004; PAGENSTECHER et al. 2006).

Em nossa casuística, todos os pacientes com alterações do tipo *missense* não tinham histórico familiar de câncer, dificultando o estudo de segregação da alteração na família. A análise das alterações novas, no que diz respeito ao tipo de troca de aminoácido e sua conservação, foram realizadas por programas *in silico* que determinam um valor específico para as mutações com grande potencial patogênico. Dessa forma, as alterações caracterizadas como patogênicas nos dois programas *in silico* foram

classificadas como deletérias. Porém, mais estudos são necessários para possibilitar uma real compreensão do efeito da alteração no tumor.

Acredita-se que as mutações em *MSH6* são preferencialmente, porém, não exclusivamente, encontradas em famílias com a SL atípica, com o início tardio da doença, com menos incidência de câncer colorretal, alta incidência de câncer de endométrio e tumores com um padrão bastante variável de microssatélites, variando de estáveis a altamente instáveis (MIYAKI et al. 1997; KOLODNER et al. 1999b; WIJNEN et al. 1999; WAGNER et al. 2001; BERENDS et al. 2002; BUTTIN et al. 2004; CEDERQUIST et al. 2004; HENDRIKS et al 2004; PLASCHKE et al. 2004).

Devido a nossa baixa casuística e apenas uma única família preenchendo os critérios de Amsterdam, não foi possível avaliar, tanto a idade média de acometimento do primeiro tumor, como também a penetrância nas famílias.

Neste estudo, detectamos três novas alterações patogênicas, uma nova alteração de resultado inconclusivo, além de outras duas alterações, já descritas, apresentando resultados conflitantes na literatura.

5.2.2 Gene *PMS1*

Apesar do fato das mutações no gene *PMS1* serem bastante escassas na literatura, com poucos relatos ao longo de mais de 15 anos após a descoberta deste gene (NICOLAIDES et al 1994; LIU et al 1996), um dos objetivos do projeto foi fazer uma caracterização completa de todos os

genes de reparo de DNA em nossas famílias brasileiras com a síndrome de Lynch.

Nesta série, dos 68 indivíduos avaliados, foram detectadas três novas alterações, todas do tipo *missense*, na qual uma delas, através da análise *in silico*, revelou ser potencialmente significativa para a doença (Tabela 4). No entanto, não foi possível estender a análise para avaliar a segregação da variante nos familiares.

Tabela 4 - Características clínicas e análise *in silico* das alterações detectadas no gene *PMS1*.

<i>PMS1</i>	Alteração	Cancer (idade)	Critério clínico	SIFT	POLYPHEN	Classificação
Família						
SL-23	p.Met539Val	Reto (34)	BG	Tol.	Possiv.	Inconclusiva
SL-91	p.Leu329Val	Cólon (48)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica
SL-2-7	p.Thr806Ser	Cólon (37)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica

5.2.3 Gene *PMS2*

Da análise dos 68 pacientes restantes, foram detectadas seis novas alterações não descritas nos bancos de dados da SL (Tabela 5). Dentre as oito alterações detectadas, sete foram do tipo *missense* e uma do tipo *frameshift*, na qual ocorreu uma duplicação de uma base nitrogenada Adenina.

Tabela 5 - Características clínicas e análise *in silico* das alterações detectadas no gene *PMS2*.

<i>PMS2</i>	Alteração	Cancer (idade)	Critério clínico	SIFT	POLYPHEN	Classificação
Família						
SL-2-7	p.Gly382Arg	Cólon (37)	BG	Tol.	Possiv.	Inconclusiva
SL-050	p.Ile679Thr	Cólon (50)	BG	Afeta	Possiv.	Patogênica
SL-060	p.Ile755Thr	Cólon (39)	BG	Afeta	Possiv.	Patogênica
SL-061	p.Pro404Arg	Cólon (56)	AC-I	Tol.	Provav.	Inconclusiva
SL-067	p.Thr511Met	Cólon (46)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica
SL-083	p.Asp414ArgfsX45	Cólon (37)	AC-I	-	-	Patogênica
SL-013	p.Met622Ile	Reto (29)	BG	Tol.	Possiv.	Inconclusiva
SL-062	p.Arg563Leu	Cólon (65)	BG	Tol.	Ben.	Não Patogênica

- **Alterações patogênicas no gene *PMS2***

Paciente SL-083

O paciente SL-083 apresentou uma duplicação de base única (c.1239Dup), criando uma um códon de parada a 45 aminoácidos depois da alteração. Esse paciente vem de uma família com longo histórico de câncer colorretal.

Paciente SL-060

O paciente SL-060 apresentou a mutação c.2264T>C (éxon 13) que levou à troca de uma isoleucina por uma treonina. Este paciente foi diagnosticado com um tumor de cólon aos 39 anos, sem histórico familiar de câncer relacionado a SL. Os resultados dos dois algoritmos utilizados nas análises *in silico* foram concordantes em afirmar que essa variante é patogênica.

Interessantemente, esse paciente já havia apresentado uma alteração *missense* no gene *MSH6*. Diferentemente de mutações que causam códons de parada prematuros (*stop codon*), alterações *missense* não necessariamente causam danos severos à proteína, de forma que é possível detectar uma marcação protéica positiva no tumor. Embora mutações compostas sejam raras. Recentemente MARTINEZ e KOLODNER (2010), trabalhando com leveduras, criaram um sistema para estudar o efeito da soma de mais de uma alteração *missense* nas taxas de mutações. Os resultados mostraram que embora uma única alteração não fosse capaz de causar qualquer dano no sistema de reparo, quando os duplos mutantes eram analisados em conjunto, o sistema de reparo se tornava completamente defeituoso. Dessa forma, ficou claro que um alelo fraco é capaz de interagir com outro alelo fraco para criar um poderoso efeito poligênico do sistema de reparo de DNA.

Paciente SL-050

O paciente SL-050 apresentou a mutação c.2036T>C que levou a troca de um aminoácido de isoleucina para uma treonina. Os resultados dos dois algoritmos utilizados nas análises *in silico* foram concordantes em afirmar que essa variante é patogênica. Este paciente foi diagnosticado com um tumor de cólon aos 50 anos, preenchendo os critérios de Bethesda, porém com duas primas com diagnóstico de câncer de mama aos 45 e 50 anos de idade e duas tias com tumor de pâncreas aos 65 e 50 anos de idade.

- **Alterações de significado desconhecido no gene *PMS2***

Paciente SL-061

Dos quatro pacientes com alterações possivelmente patogênicas, três tinham informações de imunistoquímica dos genes de reparo, exceto o paciente SL-2-7. Desse grupo, somente o paciente SL-061 apresentou perda dos dímeros MLH1-PMS2, levantando assim, a real possibilidade da alteração encontrada estar relacionada com a perda de expressão protéica. Existe a possibilidade dessa alteração estar relacionada a outros eventos, tais como grande deleções ou metilação do gene *MLH1*, porém por ser uma família que preenche os critérios de Amsterdam, uma futura análise de segregação na família é uma ótima opção para determinar o papel dessa alteração na tumorigênese da síndrome. Pela análise *in silico* essa variante foi classificada como inconclusiva.

Paciente SL-2-7

O paciente SL-2-7 é um caso bastante interessante, pois sua alteração no gene *PMS2* (c.1144G>C) está situada no último nucleotídeo do éxon 10, ao lado do sítio acceptor de *splicing*. Embora a análise *in silico* seja inconclusiva, estudos mostram que algumas alterações nesta posição podem alterar o processamento da molécula de RNA, criando novos sítios de *splicing* ou retendo íntrons, os quais alteram a sequência da proteína, formando proteínas truncadas, não funcionais. Neste caso, a avaliação da molécula de RNA pode ajudar a eliminar a possibilidade de um *splicing*

aberrante nesse paciente, antes de partir para uma análise funcional da proteína.

- **Alterações já descritas no gene *PMS2***

Paciente SL-013

O paciente SL-013 apresentou a alteração c.1866G>A no éxon 11. YUAN et al. (2002) através de estudos funcionais, verificaram que embora essa alteração não esteja no domínio de interação com a proteína MLH1, ela compromete essa interação resultando na perda do dímero MLH1-PMS2. Esse paciente teve um tumor colorretal aos 29 anos sem histórico de câncer familiar.

Paciente SL-062

O paciente SL-062 apresentou a alteração c.1688G>T já descrita anteriormente, na qual foi sugerida como uma mutação patogênica por estar localizada no domínio de ligação ao ATP (CLENDENNING et al. 2006), porém ainda não foram realizados estudos funcionais para essa variante. Essa alteração foi classificada com não patogênica pelos programas SIFT e POLYPHEN.

A maioria das alterações reportadas na literatura é do tipo *missense* e infelizmente, se torna muito difícil avaliar a significância clínica e funcional dessas alterações. Alguns estudos apresentam dados demonstrando a co-segregação da variante com a doença e a ausência dela em indivíduos

controles sem câncer, no entanto esses dados não distinguem, definitivamente, a variante patogênica de variantes raras não patogênicas (MARTINEZ e KOLODNER 2010). Diante disso, estudos funcionais tem sido a melhor estratégia para determinar se uma variante *missense* é capaz de causar uma perda da função protéica de forma a evidenciar sua patogenicidade.

De acordo com BOLAND et al. (2008) mutações no gene *PMS2* levam a um fenótipo atenuado com famílias com pouco histórico de câncer e idade mais avançada de acometimento. Neste caso, a comunicação entre o geneticista e o paciente é, em grande parte, dificultada quando se trata de estimar o risco de câncer, assim como determinar o protocolo ideal de vigilância para os portadores de mutações no *PMS2*, visto que são poucos os estudos que incluem pacientes portadores de mutação no gene *PMS2*.

Recentemente, SENTER et al. (2008) trabalhando com 39 indivíduos com mutação em *PMS2*, verificou que a idade média de diagnóstico de câncer colorretal foi de 59 anos. O risco de câncer aos 70 anos foi de 20% em homens e 15% em mulheres. Segundo os autores, portadores de mutação em *PMS2* realmente têm menores riscos de desenvolver câncer, porém uma explicação molecular ainda não está bem esclarecida e a hipótese mais descrita é de que a proteína MLH1 por ter a capacidade de formar dímeros com MLH3 e PMS1 na ausência *PMS2*, poderia compensar sua ausência durante o processo de reparo. O mesmo aconteceria com o MSH6, no qual MSH2 poderia formar dímeros com MSH3.

Nossa casuística revelou três novas alterações patogênicas, além de outras três alterações de resultados inconclusivos, na qual uma delas, através de estudos funcionais, foi descrita como patogênica.

5.2.4 Gene *CHEK2*

No Brasil, devido a uma colonização bastante diversa, nossa população é sabidamente miscigenada. Dessa forma, qualquer variante descrita na literatura pode ser relevante em nossa população. Porém, na análise de 68 famílias brasileiras, nenhuma das alterações, já descritas (*CHEK2* 1100delC, I157T, IV2+1G>A e del5395), foi encontrada, sugerindo que essas alterações no gene *CHEK2* não são relevantes na população brasileira.

Paciente SL-074

Curiosamente, o paciente SL-074 apresentou uma nova variante c.1126A>G (p.Met352Val) no éxon 10, na qual foi classificada como patogênica pela análise *in silico*. Este paciente teve um tumor metastático de cólon aos 40 anos sem histórico de câncer na família.

CYBULSKI et al. (2004), postula que variantes em *CHEK2* podem aumentar o risco de vários tipos de câncer, incluindo câncer colorretal, embora haja uma hipótese consistente de que *CHEK2* é um gene de susceptibilidade ao câncer que atua em sinergia com outros genes ou fatores para causar o câncer (MEIJERS-HEIJBOER et al. 2002; FRIEDRICHSEN et al. 2004; The *CHEK2* Breast Cancer Consortium 2004).

Desta forma, uma associação dessa nova alteração com o câncer de cólon do paciente SL-074 permanece não esclarecida, no entanto, futuras análises podem ajudar a esclarecer esse fato.

5.2.5 Gene *TP53*

Os 65 pacientes sem mutações nos genes de reparo de DNA (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*) foram analisados para o gene *TP53*.

O paciente SL-085 apresentou uma nova alteração c.478A>G (p.Met160Val), predita como possivelmente danosa pelo POLYPHEN e benigna pelo SIFT. Esse paciente preenchia os critérios de Bethesda e teve um câncer colorretal aos 38 anos. O tumor deste paciente foi testado para instabilidade de microssatélites e foi classificado com estável.

A síndrome de Li-Fraumeni (SLF) é caracterizada por mutações germinativas no gene *TP53*. A síndrome Li-Fraumeni-Like possui um critério menos estrigente que a clássica (BIRCH et al. 1994; CHOMPRET et al. 2002; OLIVIER et al. 2003), e nesse contexto, permite uma sobreposição de síndromes, incluindo o câncer de mama-ovário hereditário, a síndrome de Lynch e o câncer de mama-cólon hereditário, visto que câncer de mama é o principal tipo de tumor do espectro da SLF e o câncer colorretal tem sido encontrado em excesso em famílias com a SLF (WONG et al. 2006). Além disso, a análise das famílias com a síndrome de Lynch mostrou que o tumor de mama foi a manifestação extracolônica mais comumente encontrada, justificando uma possível ligação entre *TP53* em a Síndrome de Lynch.

Porém, neste estudo, não foram encontradas mutações no gene *TP53*, exceto o paciente SL-085 que apresentou a alteração c.478A>G (p.Met160Val) ainda não descrita em células germinativas (já reportada em tumores associados à Síndrome de Li-Fraumeni). KATO et al. (2003) através de estudos funcionais concluíram que essa alteração não teria efeito na proteína e, juntamente com os dados obtidos com a análise *in silico*, levam a crer que essa alteração não seja causadora do tumor.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Vários estudos têm lançado mão do uso dos programas SIFT e POLYPHEN para avaliar a função de polimorfismos não-sinônimos em genes candidatos. Estes dois algoritmos têm grande potencial para o rastreamento de polimorfismos potencialmente patogênicos em genes associados com risco de câncer, levando em conta a conservação evolutiva em relação a polimorfismos neutros ou deletérios. Esses programas podem prever o quanto uma variante pode ser deletéria, usando um grupo de regras empíricas baseadas na sequência, filogenética e informação estrutural da variante.

Aparentemente nossa metodologia de PCR de longo alcance é capaz de evitar a amplificação de pseudogenes possibilitando sua inclusão na prática clínica e aumentar a taxa de detecção de mutações em famílias com síndrome de Lynch.

Estudos recentes estimam que de 40% dos indivíduos preenchendo os critérios de Amsterdam não apresentam mutações nos genes de reparo de DNA e, quando pacientes com os critérios de Bethesda são incluídos, esse número pode chegar a 70% (KERBER et al. 2005, LINDOR et al. 2005, MUELLER-KOCH et al. 2005). Dessa forma, para melhorarmos as taxas de detecção de mutações, teremos que lançar mão dos avanços obtidos com as novas tecnologias de sequenciamento de nova geração, que têm como característica comum, o poder de gerar informação muitas vezes maior que

o sequenciamento capilar (realizado nesse estudo), com uma grande economia de tempo e custo por base sequenciada. Atualmente, já é possível sequenciar todo o genoma desses pacientes, o que possibilitará aumentar ao máximo os índices de detecção de mutações na SL, além de abrir espaço para a descoberta de novas síndromes relacionadas ao câncer colorretal.

Embora nem todas as alterações detectadas nesse estudo possam ser associadas à doença, as oito alterações potencialmente patogênicas (inconclusivas) encontradas deverão ser confirmadas por estudos funcionais que já estão em andamento pelo nosso grupo de pesquisa. Em breve, com o auxílio desses estudos, o percentual de mutações patogênicas poderá chegar a próximo de 50%.

Não há dúvidas de que esse tipo de estudo pode proporcionar uma melhor caracterização dessas famílias e vai continuar a nos ajudar nesta era em que a etiologia molecular da síndrome familiar de câncer vem se tornando a principal ferramenta para determinar o risco de câncer e elaboração de programas de prevenção.

7 CONCLUSÕES

- ✓ Este estudo nos mostra a consolidação de alguns resultados importantes no espectro de tumores extracolônicos no Brasil, no qual relata uma alta incidência de câncer de mama com redução de quase 20 anos na idade de acometimento, quando comparada com a população geral. Além disso, a sua relação com a SL ainda é apoiada por estudos anteriores, mostram que eles podem surgir através de defeitos no sistema de reparo DNA.
- ✓ Foram detectadas seis mutações nos três genes de reparo avaliados (*MSH6*, *PMS1* e *PMS2*), além de outras oito alterações classificadas como inconclusivas pelos programas de análise *in silico*. A inclusão do rastreamento de *MSH6*, *PMS2* e *PMS1* aumentou em 6% (6/101) a detecção de pacientes diagnosticados com a SL. Dessa forma, o percentual de famílias diagnosticadas com a SL chegou a 41% quando incluídos os genes *MLH1* e *MSH2*.
- ✓ Neste estudo, foi descrita uma nova alteração no gene *CHEK2*, porém o real efeito dessa alteração no câncer colorretal ainda é incerto e estudos adicionais serão necessários para melhor elucidar essa possível relação com a SL. Mutações germinativas no gene *TP53* não foram detectadas nos 71 indivíduos suspeitos de SL.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA Nyström-Lahti M, Järvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. **Int J Cancer** 1995; 64:430-3.

Aarnio M, Salovaara R, Aaltonen LA, Mecklin JP, Jarvinen HJ. Features of gastric cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Int J Cancer** 1997; 74:551-5.

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. **Int J Cancer** 1999; 81:214-8.

Achatz MI, Hainaut P, Ashton-Prolla P. Highly prevalent TP53 mutation predisposing to many cancers in the Brazilian population: a case for newborn screening? **Lancet Oncol** 2009; 10:920-5.

Ainsworth PJ, Kosciński D, Frasier BP, Stuart JA. Family cancer histories predictive of a high risk of hereditary non-polyposis colorectal cancer associate significantly with a genomic rearrangement in HMSH2 or HMLH1. **Clin Genet** 2004; 66:183-8.

Aebi S, Kurdi-Haider B, Gordon R et al: Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin. **Cancer Res** 1996; 56:3087-90.

Akiyama M, Sato H, Yamada T, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. **Cancer Res** 1997; 57:3920-3.

Alvarez K, Hurtado C, Hevia MA, et al. Spectrum of MLH1 and MSH2 mutations in Chilean families with suspected Lynch syndrome. **Dis Colon Rectum** 2010; 53:450-9.

Arnold CN, Goel A, Boland CR. Role of hMLH1 promoter hypermethylation in drug resistance to 5-fluorouracil in colorectal cancer cell lines. **Int J Cancer** 2003; 106:66-73.

Bachinski LL, Olufemi SE, Zhou X, et al. Genetic mapping of a third Li-Fraumeni syndrome predisposition locus to human chromosome 1q23 **Cancer Res** 2005; 65:427-31.

Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. **Fam Cancer** 2005; 4:323-33.

Baudhuin LM, Ferber MJ, Winters JL, et al. Characterization of hMLH1 and hMSH2 gene dosage alterations in Lynch syndrome patients. **Gastroenterology** 2005; 129:846-54.

Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, Hodgson SV, Harocopos CJ, Bodmer WF. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary nonpolyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. **Br J Surg** 1997; 84:233-7.

Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, et al. Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. **Am J Hum Genet** 2002; 70:26-37.

Bevan S, Houlston RS. Genetic predisposition to gastric cancer. **QJM** 1999; 92:5-10.

Birch JM, Hartley AL, Tricker KJ, et al. Prevalence and diversity of constitutional mutations in the p53 gene among 21 Li-Fraumeni families. **Cancer Res** 1994; 54:1298-304.

Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch syndrome: from bench to bedside. **Fam Cancer** 2008; 7:41-52.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Res** 1998; 58:5248-57.

Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. **Fam Cancer** 2005; 4:211-8.

Boyd J, Rhei E, Federici MG, et al. Male breast cancer in the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 1999; 53:87-91.

Brown AL, Lee CH, Schwarz JK, Mitiku N, Piwnica-Worms H, Chung JH. A human Cds1-related kinase that functions downstream of ATM protein in the cellular response to DNA damage. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:3745-50.

Bunyan DJ, Eccles DM, Sillibourne J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. **Br J Cancer** 2004; 91:1155-9.

Burchell AN, Winer RL, de Sanjose S, Franco EL. Chapter 6: epidemiology and transmission dynamics of genital HPV infection. **Vaccine** 2006; 24(Suppl 3):s52-61.

Buttin BM, Powell MA, Mutch DG, et al. Penetrance and expressivity of MSH6 germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. **Am J Hum Genet** 2004; 74:1262-9.

Caldes T, Godino J, Sanchez A et al. Immunohistochemistry and microsatellite instability testing for selecting MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Oncol Rep** 2004; 12:621-9.

Candido PBM, Santos EMM, Rossi CS, et al. Frequency of colorectal cancer and extra- colonic tumors in families that meet amsterdam criteria I and II: Results from Hospital A.C. Camargo Hereditary Colorectal Cancer Registry. **Applied Cancer Res** 2007; 27:18-22.

Cederquist K, Emanuelsson M, Goransson I, et al. Mutation analysis of the MLH1, MSH2 and MSH6 genes in patients with double primary cancers of the colorectum and the endometrium: a population-based study in northern Sweden. **Int J Cancer** 2004; 109:370-6.

Cesinaro AM, Ubiali A, Sighinolfi P, Trentini GP, Gentili F, Facchetti F. Mismatch repair proteins expressions and microsatellite instability in skin lesions with sebaceous differentiation: a study in different clinical subgroups with and without extracutaneous cancer. **Am J Dermatopathol** 2007; 29:351-58.

Charames GS, Millar AL, Pal T, Narod S, Bapat B. Do MSH6 mutations contribute to double primary cancers of the colorectum and endometrium? **Hum Genet** 2000; 107:623-629.

Chompret A. The Li-Fraumeni syndrome. **Biochimie** 2002; 84:75-82.

Clendenning M, Hampel H, LaJeunesse J, et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. **Hum Mutat** 2006; 27:490-5.

Cohen PR, Kohn SR, Kurzrock R. Association of sebaceous gland tumors and internal malignancy: the Muir-Torre syndrome. **Am J Med** 1991; 90:606-13.

Cossio SL, Koehler-Santos P, Pessini AS, et al. Clinical and histomolecular endometrial tumor characterization of patients at-risk for Lynch syndrome in South of Brazil. **Fam Cancer** 2010; 9:131-9.

Crijnen TE, Janssen-Heijnen ML, Gelderblom H, et al. Survival of patients with ovarian cancer due to a mismatch repair defect. **Fam Cancer** 2005; 4:301-5.

Cybulski C, Gorski B, Huzarski T, et al. CHEK2 is a multiorgan cancer susceptibility gene. **Am J Hum Genet** 2004; 75:1131-5.

Cyr JL, Heinen CD. Hereditary cancer-associated *missense* mutations in hMSH6 uncouple ATP hydrolysis from DNA mismatch binding. **J Biol Chem** 2008; 283:31641-8.

de Leeuw WJ, Dierssen J, Vasen HF, et al. Prediction of a mismatch repair gene defect by microsatellite instability and immunohistochemical analysis in endometrial tumours from HNPCC patients. **J Pathol** 2000; 192:328-35.

de Leeuw WJ, van Puijenbroek M, Tollenaar RA, Cornelisse CJ, Vasen HF, Morreau H. Correspondence re: A. Müller et al., Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 2002; 62:1014-9. Comment on: **Cancer Res** 2003; 63:1148-9.

De Rosa M, Fasano C, Panariello L, et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. **Oncogene** 2000; 19:1719-1723.

de Vos tot Nederveen Cappel WH, Buskens E, van Duijvendijk P, et al. Decision analysis in the surgical treatment of colorectal cancer due to a mismatch repair gene defect. **Gut** 2003; 52:1752-5.

den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. **Hum Mutat** 2000; 15:7-12.

Dominguez MV. **Caracterização de mutações por meio de sequenciamento dos genes *hMLH1* e *hMSH2* em pacientes com suspeita de Síndrome de Lynch.** São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Eisen DB, Michael DJ. Sebaceous lesions and their associated syndromes: Part II. **J Am Acad Dermatol** 2009; 61:563-78.

Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. **Br Med Bull** 2002; 64:27-43.

Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell** 1990; 61:759-67.

Felton KE, Gilchrist DM, Andrew SE Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. **Clin Genet** 2007; 71:483-98.

Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. **GLOBOCAN 2008, Cancer Incidence and Mortality Worldwide**: IARC CancerBase n°. 10 [Internet]. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>> [2011 fev 12]

Franco EL, Villa LL, Ruiz A, Costa MC. Transmission of cervical human papillomavirus infection by sexual activity: differences between low and high oncogenic risk types. **J Infect Dis** 1995; 172:756-63.

Franco EL, Duarte-Franco E. Epidemiologia e fatores de risco do câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.255-61.

Friedrichsen DM, Malone KE, Doody DR, Daling JR, Ostrander EA. Frequency of CHEK2 mutations in a population based, case-control study of breast cancer in young women. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R629-35.

Gazolli I, Loda M, Syngal S, Klodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. **Cancer Res** 2002; 62:3925-8.

Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, et al. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. **Br J Cancer** 2002; 87:892-7.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, et al. German HNPCC Consortium. Genotype phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. **J Clin Oncol** 2006; 24:4285-92.

Goodfellow PJ, Buttin BM, Herzog TJ, et al. Prevalence of defective DNA mismatch repair and MSH6 mutation in an unselected series of endometrial cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:5908-13.

Grabowski M, Mueller-Koch Y, Grasbon-Frodl E, et al. Deletions account for 17% of pathogenic germline alterations in MLH1 and MSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families. **Genet Test** 2005; 9:138-46.

Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. **Gastroenterology** 2003; 124:1574-94.

Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M et al. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. **Gut** 2007; 56:926-33.

Hampel H, Frankel WL, Martin E, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). **N Engl J Med** 2005; 352:1851-60.

Hampel H, Frankel W, Panescu J, et al. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. **Cancer Res** 2006; 66:7810-7.

Henderson TO, Amsterdam A, Bhatia S, et al. Systematic review: surveillance for breast cancer in women treated with chest radiation for childhood, adolescent, or young adult cancer. **Ann Intern Med** 2010; 152:444-55.

Hendriks YM, Wagner A, Morreau H, et al. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. **Gastroenterology** 2004; 127:17-25.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA Cancer J Clin** 2006a; 56:213-25.

Hendriks YM, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). **Gastroenterology** 2006b; 130:312-22.

Hitchins M, Williams R, Cheong K, et al. MLH1 germline epimutations as a factor in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology** 2005; 129:1392-9.

Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. **N Engl J Med** 2007; 356:697-705.

Huang J, Kuismanen SA, Liu T, et al. MSH6 and MSH3 are rarely involved in genetic predisposition to non-polipotic colon cancer. **Cancer Res** 2001; 61:1619-23.

Itoh H, Houlston RS, Harocopos C, Slack J. Risk of cancer death in first-degree relatives of patients with hereditary non-polyposis cancer syndrome (Lynch type II): a study of 130 kindreds in the United Kingdom. **Br J Surg** 1990; 77:1367-70.

Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. **Chem Rev** 2006; 106:302-23.

Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW, Hereditary and familial colon cancer. **Gastroenterology** 2010; 138:2044-58.

Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer-morphologies, genes and mutations. **Mutat Res** 1994; 310:125-33.

Jass JR. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Ann NY Acad Sci** 2000; 910:62-73.

Jass JR, Young J, Leggett BA. Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. **J Gastroenterol Hepatol** 2002; 17:17-26.

Jass JR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the rise and fall of a confusing term. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4943-50.

Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, et al. Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. **Gastroenterology** 2007; 133:48-56.

Jensen UB, Sunde L, Timshel S, et al. Mismatch repair defective breast cancer in the hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 120:777-82.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. **Curr Opin Genet Dev** 2000; 10:157-61.

Jiricny J. Mediating mismatch repair. **Nat Genet.** 2000; 24:6-8.

Johns LE, Houlston RS. A systematic review and meta-analysis of familial colorectal cancer risk. **Am J Gastroenterol** 2001; 96:2992-3003.

Kariola R, Raevaara TE, Lonnqvist KE, Nystrom-Lahti M. Functional analysis of MSH6 mutations linked to kindreds with putative hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. **Hum Mol Genet** 2002; 11:1303-10.

Kariola R, Otway R, Lonnqvist KE, et al. Two mismatch repair gene mutations found in a colon cancer patient – which one is pathogenic? **Hum Genet** 2003; 112:105-9.

Kariola R, Hampel H, Frankel WL, Raevaara TE, de la Chapelle A, Nystrom-Lahti M. MSH6 *missense* mutations are often associated with no or low cancer susceptibility. **Br J Cancer** 2004; 91:1287-92.

Kato S, Han SY, Liu W, et al. Understanding the function-structure and function-mutation relationships of p53 tumor suppressor protein by high-resolution *missense* mutation analysis. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8424-9.

Kerber R, Neklason DW, Samowitz WS, Burt RW. Frequency of familial colon cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a large population database. **Fam Cancer** 2005; 4:239-244.

Kim SK, DO JE, Kang HY, Lee ES, Kim YC. Combination of topical 5-aminolevulinic acid photodynamic therapy with carbon dioxide laser for sebaceous hyperplasia. **J Am Acad Dermatol** 2007; 56:523-4.

Kjaer SK, Chackerian B, van den Brule AJ, et al. High-risk human papillomavirus is sexually transmitted: evidence from a follow-up study of virgins starting sexual activity (intercourse). **Cancer Epidemiol Biomark Prev** 2001; 10:101-6.

Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci** 1971; 68:820-3.

Kolodner RD, Marsischky GT. Eukariotic DNA mismatch repair. **Current Opinion in Genetics & Development** 1999a; 9:89-95.

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL et al. Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. **Cancer Res** 1999b; 59:5068-74.

Laccarino I, Marra G, Palombo F, Jirincny J. hMSH6 play distinct roles in mismatch binding and contribute differently to the ATPase activity of hMUTS α . **EMBO J** 1998; 17:2677-86.

Lee JS, Collins KM, Brown AL, Lee CH, Chung JH. hCds1-mediated phosphorylation of BRCA1 regulates the DNA damage response. **Nature** 2000; 404:201-4.

Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. **JAMA** 2005; 293:1979-85.

Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. **Nat Med** 1996; 2:169-74.

Loukola A, Vilkki S, Singh J. Germline and somatic mutation analysis of MLH3 in MSI-Positive colorectal cancer. **Am J Pathol** 2000; 157:347-52.

Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. **Gastroenterology** 1993; 104:1535-49.

Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). **Cancer Genet Cytogenet** 1997; 93:84-99.

Lynch HT, Watson P, Shaw TG, et al. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part 1: studies of cancer families. **Cancer** 1999; 86:1629-36.

Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. **J Med Genet** 1999; 36:801-18.

Lynch HT. Family Information Service and Hereditary Cancer, **Cancer** 2001; 91:625-8.

Lynch HT, Grady W, Suriano G, Huntsman D. Gastric cancer: new genetic developments. **J Surg Oncol** 2005; 90:114-33.

Lynch HT, Boland CR, Gong G. et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. **Eur J Hum Genet** 2006; 14:390-402.

Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of Hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. **CMAJ** 2009a; 181:273-80.

Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. **Clin Genet** 2009b; 76:1-18.

Mangold E, Pagenstecher C, Leister M, et al. A genotype correlation in HNPCC: strong predominance of MSH2 mutations in 41 patients with Muir-Torre syndrome. **J Med Genet** 2004; 41:567-72.

Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87:1114-25.

Martinez SL, Kolodner RD. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions. **Proc Natl Acad Sci USA** 2010; 107:5070-5.

Mecklin JP, Jarvinen HJ, Virolainen M. The association between cholangiocarcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. **Cancer**. 1992; 69:1112-4.

Meijers-Heijboer H, van den Ouweland A, Klijn J, et al. Low-penetrance susceptibility to breast cancer due to CHEK2(*)1100delC in noncarriers of BRCA1 or BRCA2 mutations. **Nature Genet** 2002; 31:55-9.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H et al. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1308-14.

Menko FH, Kaspers GL, Meijer GA, Claes K, van Hagen JM, Gille JJ. A homozygous MSH6 mutation in a child with café-au-lait spots, oligodendroglioma and rectal cancer. **Fam Cancer** 2004; 3:123-7.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2009.

Miyaki M, Konishi M, Tanaka K et al. Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nat Genet** 1997; 17:271-272.

Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, et al. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2004; 2:147-56.

Modrich P. Mechanisms in Eukariotic mismatch repair. **J Biol Chem** 2006; 281:30305-9.

Mueller-Koch Y, Vogelsang H, Kopp R, et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. **Gut** 2005; 54:1733-40.

Muller A, Edmonston TB, Corao DA, et al. Exclusion of breast cancer as an integral tumor of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 2002; 62:1014-9.

Nakagawa H, Hampel H, La Chapelle A. Identification and characterization of genomic rearrangements of MSH2 and MLH1 in Lynch syndrome (HNPCC) by novel techniques. **Hum Mutat** 2003; 22:258.

Nakagawa H, Lockman JC, Frankel WL, et al. Mismatch repair gene PMS2: Disease-causing germline mutations are frequent in patients whose tumors stain negative for PMS2 protein, but paralogous genes obscure mutation detection and interpretation. **Cancer Res** 2004; 64:4721-7.

Nelson CL, Sellers TA, Rich SS, Potter JD, McGovern PG, Kushi LH. Familial clustering of colon, breast, uterine, and ovarian cancers as assessed by family history. **Genet Epidemiol** 1993; 10:235-44.

Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 1994; 371:75-80.

Niessen RC, Sijmons RH, Berends MJ, Ou J, Hofstra RM, Kleibeuker JH. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: identification of mutation carriers and assessing pathogenicity of mutations. **Scand J Gastroenterol** 2004; 241:70-7.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. *Genome Res.* 2001; 11:863-74.

Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF. **Thompson e Thompson genética médica.** 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2002.

Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, Baranovskaya S, Malkhosyan SR, Perucho M. Germeline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene* 2001; 272:301-13.

Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, et al. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis CRC (LS) and familial CRC (FCC) Brazilian families: an analysis by a Brazilian Hereditary CRC Institutional Registry. *Fam Cancer* 2004; 3:41-7.

Oliveira LP. **Avaliação de instabilidade de microssatélites e expressão imunohistoquímica das proteínas hMLH1 e hMSH2 em pacientes com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose.** São Paulo; 2008. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antonio Prudente].

Olivier M, Goldgar DE, Sodha N, et al. Li-Fraumeni and related syndromes: correlation between tumor type, family structure, and TP53 genotype. *Cancer Res* 2003; 63:6643-50.

Orta L, Klimstra DS, Qin J, et al. Towards identification of hereditary of DNA mismatch repair deficiency: Sebaceous neoplasm warrants routine immunohistochemical screening regardless of patient's age or other clinical characteristics. *Am J Surg Pathol* 2009; 33:934-44.

Pagenstecher C, Wehner M, Friedl W et al. Aberrant *splicing* in MLH1 and MSH2 due to exonic and *intronic* variants. *Hum Genet* 2006; 119:9-22.

Palmero EI, Schüler-Faccini L, Caleffi M, et al. Detection of R337H, a germline TP53 mutation predisposing to multiple cancers, in asymptomatic women participating in a breast cancer screening program in Southern Brazil. **Cancer Lett** 2008; 261:21-5.

Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline *MLH1* e *MSH2* mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: Implications for genetic testing. **World J Gastroenterol** 2007; 13:2727-32.

Parc Y, Boisson C, Thomas G, Olschwang S. Cancer risk in 348 French *MSH2* or *MLH1* gene carriers. **J Med Genet** 2003; 40:208-13.

Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of the collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Gastroenterology** 1997; 113:1146-58.

Peltomaki P. DNA mismatch repair and cancer. **Mutat Res** 2001; 488:77-85.

Peltomaki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. **J Clin Oncol** 2003; 21:1174-9.

Peltomaki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition-Update of ICG-HNPCC/InSiGHT mutation database. **Dis Markers** 2004; 20:269-276.

Peltomaki P. Lynch syndrome genes. **Fam Cancer** 2005; 4:227-232.

Peterlongo P, Nafa K, Lerman GS et al. *MSH6* germline mutations are rare in colorectal cancer families. **Int J Cancer** 2003; 107:571-9.

Peyton CL, Gravitt PE, Hunt WC, et al. Determinants of genital human papillomavirus detection in a US population. **J Infect Dis** 2001; 183:1554-64.

Pitorius S, Görgens H, Plaschke J, et al. Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. **Cancer Lett** 2007; 248:89-93.

Plaschke J, Engel C, Kruger S, et al. Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. **J Clin Oncol** 2004; 22:4486-94.

Plaschke J, Kruppa C, Tischler R, et al. Sequence analysis of the mismatch repair gene hMLH6 in the germline of patients with familial and sporadic colorectal cancer. **Int J Cancer** 2000; 85:606-13.

Ponti G, Leon MP. Muir-Torre Syndrome. **Lancet Oncol** 2005; 6:980-87.

Ponti G, Venesio T, Losi L et al. BRAF Mutations in multiple sebaceous hyperplasias of patients belonging to MYH: associated polyposis pedigrees. **J Invest Dermatol** 2007; 127:1387-91.

Ramensky V, Bork P, Sunyaev S. Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* 2002; 30:3894-900.

Ripperger T, Beger C, Rahner N, et al. Constitutional mismatch repair deficiency and childhood leukemia/lymphoma-report on a novel biallelic MSH6 mutation. **Haematologica** 2010; 95:841-4.

Risinger JI, Barrett JC, Watson P Lynch HT, Boyd J. Molecular genetic evidence of the occurrence of breast cancer as an integral tumor in patients with the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. **Cancer** 1996; 77:1836-43.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1758-62.

Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Lynch HT, et al. Characteristics of small bowel carcinoma in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. International Collaborative Group on HNPCC. **Cancer** 1998; 83:240-4.

Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:555-61.

Rountree MR, Bachman KE, Herman JG, Baylin SB. DNA methylation, chromatin inheritance, and cancer. **Oncogene** 2001; 20:3156-65.

Schulmann K, Brasch FE, Kunstmann E, et al. HNPCC-associated small bowel cancer: Clinical and molecular characteristics. **Gastroenterology** 2005; 128:590-9.

Scott RJ, McPhillips M, Meldrum CJ et al. Hereditary non-polyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. **Am J Hum Genet** 2001; 68:118-27.

Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. **Gastroenterology** 2008; 135:419-28.

Shimizu Y, Ikeda S, Fujimori M, et al. Frequent alterations in the Wnt signaling pathway in colorectal cancer with microsatellite instability. **Genes Chromosomes Cancer** 2002; 33:73-81.

Shin K, Shin J, Kim J, Park J. Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes hMSH2 and hMLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the hMSH2 gene. **Cancer Res** 2002; 62:38-42.

Sijmons RH, Kiemeneij LA, Witjes JA, Vasen HF. Urinary tract cancer and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: risks and screening options. **J Urol** 1998; 60:466-70.

Silva FC, Valentin MD, Ferreira F de O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J** 2009; 127:46-51.

Singh RS, Grayson W, Redston M, et al. Site and tumor type predicts DNA mismatch repair status in cutaneous sebaceous neoplasia. **Am J Surg Pathol** 2008; 32:936-42.

Suchy J, Cybulski C, Wokołorczyk D, et al. CHEK2 mutations and HNPCC-related colorectal cancer. **Int J Cancer** 2010; 126:3005-9.

Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germ-line epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. **Nat Genet** 2004; 36:497-501.

Tanyi M, Olasz J, Lukács G, et al. Pedigree and genetic analysis of a novel mutation carrier patient suffering from hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2006; 12:1192-7.

Tate PH, Bird AP. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. **Curr Opin Genet Dev** 1993; 3:226-31.

The CHEK2 Breast Cancer Consortium 2004: CHEK2*1100delC and susceptibility to breast cancer: a collaborative analysis involving 10,860 breast cancer cases and 9,065 controls from 10 studies. **Am J Hum Genet** 2004; 74:1175-82.

Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. **Science** 1993; 260:846-19.

van den Bos M, van den Hoven M, Jongejan E, et al. More differences between HNPCC-related and sporadic carcinomas from the endometrium as compared to the colon. **Am J Surg Pathol** 2004; 28:706-11.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34:424-5.

Vasen HF, Nagengast FM, Khan PM. Interval cancers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **Lancet** 1995; 345:1183-4.

Vasen HF, Sanders EA, Taal BG, et al. The risk of brain tumours in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). **Int J Cancer** 1996a; 65:422-5.

Vasen HF, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. **Gastroenterology** 1996b; 110:1020-7.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome)

proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vasen HF, Morreau H, Nortier JW. Is breast cancer part of the tumor spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? **Am J Hum Genet** 2001a; 68:1533-5.

Vasen HF, Stormorken A, Menko FH et al. MSH2 mutation carriers are at higher risk of cancer than MLH1 mutation carriers: a study of hereditary non-polyposis colorectal cancer families. **J Clin Oncol** 2001b; 19:4074-4080.

Vasen HFA. Clinical description of the Lynch syndrome [Hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC)]. **Fam cancer** 2005; 4:219-25.

Vasen HF, Möslein G, Alonso A, et al. Recommendations to improve identification of hereditary and familial colorectal cancer in Europe. **Fam Cancer** 2010; 9:109-15.

Vernez M, Hutter P, Monnerat C, Halkic N, Gugerli O, Bouzourene H. A case of Muir-Torre syndrome associated with mucinous hepatic cholangiocarcinoma and a novel germline mutation of the MSH2 gene. **Fam Cancer** 2007; 6:141-5.

Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer EJ et al. Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree. **J Med Genet** 2001; 38:318-22.

Wagner A, Barrows A, Wijnen JT et al. Molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the MSH2 gene. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1088-100.

Walsh MD, Buchanan DD, Walters R, et al. Analysis of families with Lynch syndrome complicated by advanced serrated neoplasia: the importance of pathology review and pedigree analysis. **Fam Cancer** 2009; 8:313-23.

Wang Y, Friedl W, Lamberti C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. **Int J Cancer** 2003; 103:636-41.

Wasielewski M, Vasen H, Wijnen J, et al. CHEK2 1100delC is a susceptibility allele for HNPCC-related colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:4989-94.

Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer** 1993; 71:677-85.

Watson P, Lynch HT. Cancer risk in mismatch repair gene mutation carriers. **Fam Cancer** 2001; 1:57-60.

Watson P, Vasen HF, Mecklin J-P, et al. The Risk of Extra-colonic, extra-endometrial Cancer in the Lynch Syndrome. **Int J Cancer** 2008; 123:444-9.

Westenend PJ, Schütte R, Hoogmans MM, Wagner A, Dinjens WN. Breast cancer in an MSH2 gene mutation carrier. **Hum Pathol** 2005; 36:1322-6.

Wijnen J, Khan PD, Vasen H, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. **Am J Hum Genet** 1997; 61:329-35.

Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. **Nat Genet** 1998; 20:326-8.

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. **Nat Genet** 1999; 23:142-4.

Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? **Hum Genet** 2008; 124:105-22.

Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. **Gastroenterology**. 2006; 130:73-9.

Woods MO, Hyde AJ, Curtis FK, et al. High frequency of hereditary colorectal cancer in Newfoundland likely involves novel susceptibility genes. **Clin Cancer Res** 2005; 11:6853-61.

Wu Y, Berends MJ, Mensink RG, et al. Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. **Am J Hum Genet** 1999; 65:1291-8.

Yang H, Sasaki T, Minoshima S, Shimizu N. Identification of three novel proteins (SGSM1, 2, 3) which modulate small G protein (RAP and RAB)-mediated signaling pathway. **Genomics** 2007; 90:249-60.

Yap HL, Chieng WS, Lim JR, et al. Recurring MLH1 deleterious mutations in unrelated Chinese Lynch syndrome families in Singapore. **Fam Cancer** 2009; 8:85-94.

Yuan ZQ, Gottlieb B, Beitel LK, et al. Polymorphisms and HNPCC: PMS2-MLH1 protein interactions diminished by single nucleotide polymorphisms. **Hum Mutat** 2002; 19:108-13.

Zhang J, Lindroos A, Ollila S, et al. Gene conversion is a frequent mechanism of inactivation of the wild-type allele in cancers from MLH1/MSH2 deletion carriers. **Cancer Res** 2006; 2:659-64.

ANEXOS

Anexo 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Indivíduos com Câncer Colorretal com Sequenciamento de *hMLH1* e *hMSH2* Inconclusivo

TERMO DE CONSENTIMENTO PÓS-INFORMADO

(Obrigatório para Pesquisa Clínica em Seres Humanos – Resolução N. 196/96 e resolução CNS 252/97 do Ministério da Saúde)

PROJETO: Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal e ao Câncer de Mama: Manejo de Pacientes de Alto Risco e Suas Famílias *Diagnóstico Clínico e Molecular, Aconselhamento de Risco e Implantação de um Sistema de Registro e Gerenciamento de Dados Oncogenéticos*

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PACIENTE OU RESPONSÁVEL LEGAL

NOME DO PACIENTE: _____

Sexo: masculino feminino Data de nascimento: ___/___/___

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

RESPONSÁVEL: _____

Sexo: masculino feminino Data de nascimento: ___/___/___

Documento de identidade n.: _____

Endereço: _____

Número: _____ Complemento: _____

Cidade: _____ Estado: _____

CEP: _____ TEL: _____

OBJETIVOS DO ESTUDO

Você foi convidado a participar deste estudo, pois sua família pode ser portadora de uma síndrome hereditária que aumenta o risco de câncer e não foi identificada mutação nos genes *hMLH1* e *hMSH2*. Este risco aumentado pode ser consequência de alteração nos genes.

Este estudo tem por objetivos:

- Verificar se indivíduos que pertencem a famílias com elevado número de casos de câncer do intestino grosso ou mama sem alterações nos genes *hMLH1* e *hMSH2* têm alterações em um dos seguintes genes: *MSH6*, *PMS2*, *CHEK2* ou *TP53*.
- Verificar se os tumores dos indivíduos com alterações em um desses genes têm características clínicas diferentes (local, tamanho, tipo de tumor).

O câncer é uma doença genética, ou seja, é causada por alterações nos genes. Mas a maioria dos tumores malignos é esporádica, ou seja, as alterações genéticas não são passadas de pai para filho (não são hereditárias).

A maioria dos tumores de intestino grosso é esporádica. Porém, entre 5% a 10% dos casos (ou um em cada 10 tumores do intestino grosso), são chamados hereditários, pois são causados por alterações nos genes chamadas mutações que podem ser transmitidas de geração para geração.

Os genes são códigos dentro das células que funcionam como programas que determinam como as células do organismo devem funcionar. Quando ocorrem as alterações chamadas mutações, os genes podem não funcionar direito e enviar sinais errados para o funcionamento das células. Quando as mutações ocorrem em genes que atuam no crescimento das células, isto pode levar ao desenvolvimento de tumores.

Existem diversas doenças hereditárias que aumentam o risco de câncer do intestino grosso, dentre elas está o HNPCC (câncer colorretal hereditário sem polipose) e a síndrome mama-cólon. Para o diagnóstico da doença HNPCC há um critério clínico (características baseadas na história familiar) e o diagnóstico molecular (feito através de um exame de sangue específico). Em 60% dos casos é possível identificar mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2*, *hMSH6* e *hPMS2* no entanto nos outros 40% não é possível identificar estas mutações, ou porque a técnica utilizada no laboratório não conseguiu identificar estas alterações, ou porque existem outros genes alterados. Também há a síndrome mama-cólon, na

qual, em algumas famílias é observado um elevado número de casos de câncer de mama e câncer de intestino grosso. Esta síndrome pode estar associada a alterações em um gene chamado *CHEK2*.

PROCEDIMENTOS

Após a assinatura deste consentimento (autorização para o estudo), você realizará uma entrevista com a enfermeira que irá explicar todos os procedimentos. A história de câncer da sua família será revisada. Ao terminar esta entrevista, você será encaminhado ao laboratório para a retirada da amostra de sangue. No laboratório serão retirados 20ml de sangue (aproximadamente duas colheres de sopa) através de uma agulha colocada no seu braço. O sangue será colocado em dois tubos, identificado e enviado ao laboratório para análise. No laboratório, o sangue passará por uma máquina que irá verificar se os genes *hMSH6*, *hPMS2*, *CHEK2* e *TP53* têm alguma alteração. Essas alterações são chamadas mutações.

Além de avaliar o seu sangue, iremos avaliar um pedaço do tumor que foi retirado na sua cirurgia e está guardado no arquivo do hospital. É possível que algumas das alterações observadas nos genes retirados do seu sangue possam estar presentes no tumor. Estas alterações são chamadas de instabilidade de microssatélites.

Uma vez que os testes estiverem prontos, você será comunicado por telefone e deverá marcar uma consulta com o médico que solicitou o exame.

Quando o resultado estiver pronto, você receberá um contato por telefone para agendar uma consulta de retorno. Nesta consulta será divulgado o resultado, e serão discutidas as implicações do teste sobre o risco de câncer do intestino grosso. Você pode se recusar a receber o resultado. Será oferecido apoio de uma psicóloga caso deseje.

Existem três possibilidades de resultados:

1 – você pode ter a alteração nos genes *hMSH6*, *hPMS2*, *CHEK2* e *TP53* que está associada a um maior risco de câncer de intestino grosso; é o que chamamos de resultado positivo; se você tem a alteração no gene, tem 50% de chance de passar a alteração para os seus filhos. O fato de ter alteração não significa que a pessoa irá ter câncer. Um indivíduo com alteração em um dos genes examinados tem entre 20 a 80% de risco de desenvolver câncer do intestino grosso durante toda a vida. Algumas pessoas com a alteração genética não têm câncer. Uma pessoa que tem a alteração pode realizar acompanhamento para detectar o câncer.

Este acompanhamento consiste de colonoscopia, endoscopia, ultrassonografia do abdome e exame de urina anuais;

2 – o exame não identificou alterações nos genes *hMSH6*, *hPMS2*, *CHEK2* e *TP53*. Isto é chamado de resultado inconclusivo. Isto pode ocorrer em duas situações: você tem alterações em outros genes que não foram estudados, ou o teste de laboratório utilizado não conseguiu encontrar a alteração; os indivíduos com teste inconclusivo devem prosseguir com os exames de seguimento;

3 – o exame encontrou uma alteração que não é possível determinar se ela está associada a um risco maior de câncer.

O resultado será divulgado apenas para você. Você pode optar, em qualquer momento do estudo, a não saber do resultado dos exames. A decisão de contar aos seus familiares é sua. Os seus familiares podem se beneficiar com esta informação, pois podem programar com que frequência os exames de seguimento podem ser realizados. O seu teste não terá custo.

BENEFÍCIOS

A participação estudo pode não trazer benefícios para você ou para os membros de sua família; mas pode ajudar os médicos a compreender como o câncer se desenvolve. Se o teste mostrar que você tem alteração no gene, isto pode auxiliar o médico nas orientações que serão fornecidas sobre os exames preventivos.

RISCOS

Os riscos associados com sua participação nesse estudo são dor ou queimação no local da retirada da amostra de sangue para o exame. Não há previsão de indenização para eventuais danos.

Além disso, o teste pode causar alterações psicológicas. Ao saber sobre o seu risco de câncer devido alterações nos genes você poder sentir aumento na ansiedade, ou raiva, ou medo do futuro. Será oferecido apoio de uma psicóloga caso deseje, sem custo a você.

REEMBOLSO AO PACIENTE

Você não receberá nenhum tipo de remuneração financeira pela sua participação neste estudo. Entretanto, você será reembolsado pelas despesas decorrentes da sua participação, tais como transporte e alimentação, se necessário.

ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo e também pelo Conselho Nacional de Ética em Pesquisa, órgão do Ministério da Saúde.

A confidencialidade das suas informações será mantida. Apenas as pessoas envolvidas diretamente nesse estudo poderão inspecionar as informações se necessário. Cada família e cada indivíduo inserido na família terá um número identificador para manter a privacidade. Esse número será o meio pelo qual você será identificado. Seu nome e informações pessoais não serão incluídos em nenhum estudo de pesquisa que possa fazer uso de seu sangue e/ou de pedaço de tecido, nem serão incluídos divulgação dos resultados em revistas científicas.

O material para este estudo permanecerá armazenado durante 2 anos, que é o período de execução do projeto e não será utilizado para nenhum outro estudo sem o seu sua aprovação.

A sua participação neste estudo é voluntária, portanto, você tem o direito de retirar-se do estudo a qualquer momento. Sua recusa ou desistência não irá prejudicar o seu tratamento ou seguimento tratamento.

A pesquisa pode ser suspensa ou encerrada a qualquer momento pelo Hospital A.C. Camargo, ou pelo responsável do estudo, ou pelo Comitê de Ética em Pesquisa, ou pelos órgãos de fiscalização, caso seja verificada que o estudo possa oferecer prejuízo aos sujeitos de pesquisa. Isto poderá acontecer sem aviso prévio, no entanto o paciente será notificado por contato telefônico a ser realizado por um dos pesquisadores do estudo.

Qualquer dúvida sobre o estudo, você poderá entrar em contato com a enfermeira Erika no telefone 2189 5000 ramal 2304 ou com o pesquisador responsável Ricardo Renzo Brentani, no telefone 2189 5090. Se os pesquisadores não fornecerem as informações ou esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Coordenador do Comitê de Ética do Hospital do Câncer – SP, pelo telefone 2189.5020.

Declaro que fui esclarecido:

- sobre os procedimentos, riscos e benefícios sobre este estudo;
- que tenho liberdade em retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto traga prejuízo a continuidade do meu tratamento;
- que não haverá remuneração financeira para este estudo;

- sobre a segurança de que minha identidade será preservada, mantendo-se todas as informações em caráter confidencial.

Concordo em participar deste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de ____.

Assinatura do paciente ou responsável/representante local

Nome do pesquisador ou representante que explicou este consentimento

Assinatura do pesquisador ou representante

Anexo 2 - Purificação de DNA

O DNA genômico foi extraído usando o Puregene® Blood Kit DNA Isolation (Life Sciences, SP, Brasil) seguindo as especificações da empresa. De forma resumida, a extração de DNA foi realizada a partir de um dos tubos contendo o *buffy coat* de cada paciente. O *buffy coat* foi transferido para um microtubo contendo 600 µl de Solução de Lise Celular; submetido à *vortex* em alta velocidade e levado ao banho maria a 55°C por 1 hora. Em seguida foi adicionado 140 µl de Solução de Precipitação de Proteína e de novo submetido à *vortex*; centrifugado a 2000g por 5 minutos a temperatura ambiente; e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo contendo 600 µl de Isopropanol 100%. O tubo contendo a mistura foi invertido 50 vezes para homogeneização e submetido à centrifugação a 2000g por 3 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado. O precipitado foi lavado com 1 ml de Etanol 75% por inversão e submetido à centrifugação a 2000g por 1 minuto a 4°C. O sobrenadante foi retirado com cuidado e o tubo foi invertido e deixado a temperatura ambiente para secagem completa do precipitado. Em seguida, foi adicionado 30 µl de Solução de Hidratação de DNA ao precipitado. Finalmente, a mistura foi deixada *overnight* a temperatura ambiente para completa eluição do DNA e, em seguida acondicionada a -20°C.

Anexo 3 - Hibridação Genômica Comparativa (CGH-ARRAY)

Este experimento foi conduzido somente para um paciente (SL-030) da amostra rastreada para mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2*.

Os perfis de variação no número de cópias do paciente SL-030 foram analisados pela metodologia de CGH-array, utilizando-se a plataforma de 4x180K (*Agilent Technologies*, Santa Clara, CA, USA). Esta é uma plataforma de oligonucleotídeos com aproximadamente 170.000 sondas de 60pb que mapeiam genes particularmente envolvidos em câncer e outras sequências codificadoras e não-codificadoras (<http://www.chem.agilent.com>), presentes no banco de dados genômicos UCSC Hg18 (NCBI Build 36, March 2006).

Para a análise da variação do número de cópias (CNVs) foi utilizado DNA genômico (gDNA) obtido a partir de leucócitos do sangue periférico do paciente. Como referência, foi usado gDNA comercial normal (Promega, Mannheim, Germany) pareado de acordo com o sexo.

Tanto o DNA genômico teste quanto o comercial foram digeridos pelas enzimas de restrição *Alu I* e *Rsa I* (Promega, Madison, WI). Em seguida, as amostras foram marcadas diferencialmente por *random priming* usando Cy3- ou Cy5-dCTP (kit de marcação fluorescente *Agilent Technologies*). As amostras marcadas foram purificadas para a remoção das cianinas, não incorporadas ao gDNA, utilizando as colunas *Illustra ProbeQuant G-50 Micro Columns*, GE. O procedimento de hibridação e lavagem foi realizado de acordo com os protocolos da Agilent (*Agilent Technologies*). Os dados foram extraídos utilizando o *software Feature Extraction* e analisados no *software DNA Analytics*, versão *Genomic Worchbench 5.0* (*Agilent Technologies*).

O algoritmo estatístico utilizado na análise foi ADM-2. Além disso, foram utilizadas as correções para *Centralization* e *Fuzzy Zero*, os quais são usados para remover pequenas variações nas razões de \log_2 . Essas

correções também são aplicadas para fornecer informações sobre a qualidade de cada sonda analisada. Para este estudo, foi criado um filtro específico como parâmetro para detecção inicial de alterações genômicas: *log ratio error* de 0,5, limiar de sensibilidade de 6,7 e presença de no mínimo três sondas consecutivas com valores $-0,3 \leq \log_2 \geq 0,3$ para considerar um determinado segmento como possível região de perda ou ganho.

As regiões identificadas como alteradas foram comparadas com o banco público de dados Database of Genomic Variants (DGV – <http://projects.tcag.ca/variation/>). Os experimentos de CNVs foram realizados pela Dra. Ana Krepischi.

Anexo 4 - MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*)

Este experimento foi conduzido somente para um paciente (SL-030) da amostra rastreada para mutações nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *TP53* e *CHEK2*.

O MLPA foi realizado a partir do DNA genômico isolado dos leucócitos do sangue periférico. Os Rearranjos genômicos nos genes *MLH1* e *MSH2* foram avaliados pelo kit P003 (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) e realizada de acordo com o protocolo fornecido. O kit de teste para *MLH1/MSH2* contém 16 sondas para *MSH2*, 19 sondas para *MLH1* e 7 sondas de controle específico de sequências de DNA fora desses genes.

500 ng de DNA foi desnaturado em 5 ul de água ultra pura a 98 °C por 10 minutos e incubadas com a mistura de sondas por 16 horas a 60 °C. Após a hibridização da sonda, a ligação se procedeu por 15 min a 54 °C. Então, produtos de ligação foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), utilizando um *primer* FAM marcado e um *primer* não marcado. Os produtos da PCR foram analisados no sequenciador ABI 3130 utilizando o GeneMapper software (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Os picos específicos correspondentes a cada éxon foram identificados de acordo com suas migrações em relação aos padrões de tamanho. As alturas de pico de cada fragmento, foram comparados com os das amostras controle e a suspeita de deleções ocorreram quando a altura máxima diferiu em mais de 30%.

Anexo 5 - Extração das Células Brancas do Sangue

Para realizar da extração das células brancas a partir do sangue periférico dos 71 indivíduos selecionados, seguiu-se o seguinte protocolo:

1. O tubo vacuum tainer foi centrifugado por 10-30 minutos a 1000 rcf a temperatura ambiente;
2. Transferiu-se o sangue do *vacuum tainer* para um tubo de 50mL e completou-se com TE (pH 8,0) até 40mL;
3. Foi vortexado por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugado a 2500 rpm por 7 minutos;
4. Aspirou-se 35mL e deixar 5mL no tubo, vortexou o restante e adicionou 15mL TE até completar 20mL no tubo de 50mL;
5. Vortexou-se por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugou a 2000 rpm por 7 minutos;
6. Passos 4 e 5 foram repetidos;
7. Aspirou-se 15mL do lisado, vortexou os 5 mL restantes e distribuiu em 1 a 4 tubos de 1,5mL (\pm 1mL para cada tubo);
8. Foi centrifugado por 2 minutos *full speed* (1500rpm) e o sobrenadante desprezado;
9. Foi acondicionado em freezer -80°C.

Anexo 6 - Características clínicas dos indivíduos, descrição e resultados das análises *in silico* das alterações detectadas nos genes *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *CHEK2* e *TP53*

Família	Éxon	Alteração	Consequência	Criterio clínico	SIFT	POLYPHEN	Classificação
<i>MSH6</i>							
SL-2-13	6	c.3487G>T	p.Glu1163X	BG	-	-	Patogênica
SL-030	9	c.3974_3976del	p.Lys1325del	BG	-	-	Patogênica
SL-047	4	c.2379_2380del	p.Ala794HisfsX9	ACII	-	-	Patogênica
SL-069	1	c.124C>T	p.Pro42Ser	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
SL-069	4	c.1338A>T	p.Glu446Asp		Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-069	4	c.1932G>C	p.Arg644Ser		Tolerada	Benigna	Não patogênica
SL-078	9	c.3911G>A	p.Arg1304Lys	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
SL-061	2	c.431G>T	p.Ser144Ile	ACI	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-060	4	c.2633T>C	p.Val878Ala	BG	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-088	4	c.2633T>C	p.Val878Ala	BG	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
<i>PMS1</i>							
SL-023	9	c.1625A>G	p.Met539Val	BG	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-091	9	c.985C>G	p.Leu329Val	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
SL-2-7	11	c.2417C>G	p.Thr806Ser	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
<i>PMS2</i>							
SL-2-7	10	c.1144G>C	p.Gly382Arg	BG	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-050	12	c.2036T>C	p.Ile679Thr	BG	Afeta Proteína	Possivelmente	Patogênica
SL-060	13	c.2264T>C	p.Ile755Thr	BG	Afeta Proteína	Possivelmente	Patogênica
SL-061	11	c.1211C>G	p.Pro404Arg	AC-I	Tolerada	Provavelmente	Inconclusiva
SL-067	11	c.1532C>T	p.Thr511Met	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
SL-083	11	c.1239Dup	p.Asp414ArgfsX45	AC-I	-	-	Patogênica
SL-013	11	c.1866G>A	p.Met622Ile	BG	Tolerada	Possivelmente	Inconclusiva
SL-062	11	c.1688G>T	p.Arg563Leu	BG	Tolerada	Benigna	Não patogênica
<i>CHEK2</i>							
SL-074	10	c.1126A>G	p.Met352Val	BG	Afeta Proteína	Provavelmente	Patogênica
<i>TP53</i>							
SL-085	5	c.478A>G	p.Met160Val	BG	Tolerada	Possivelmente	Não patogênica

Anexo 7 - Heredograma das famílias com Alteração identificada

LEGENDA



Mulher afetada por câncer



Homem afetado por câncer



Homem falecido

RV

Relato verbal

RM

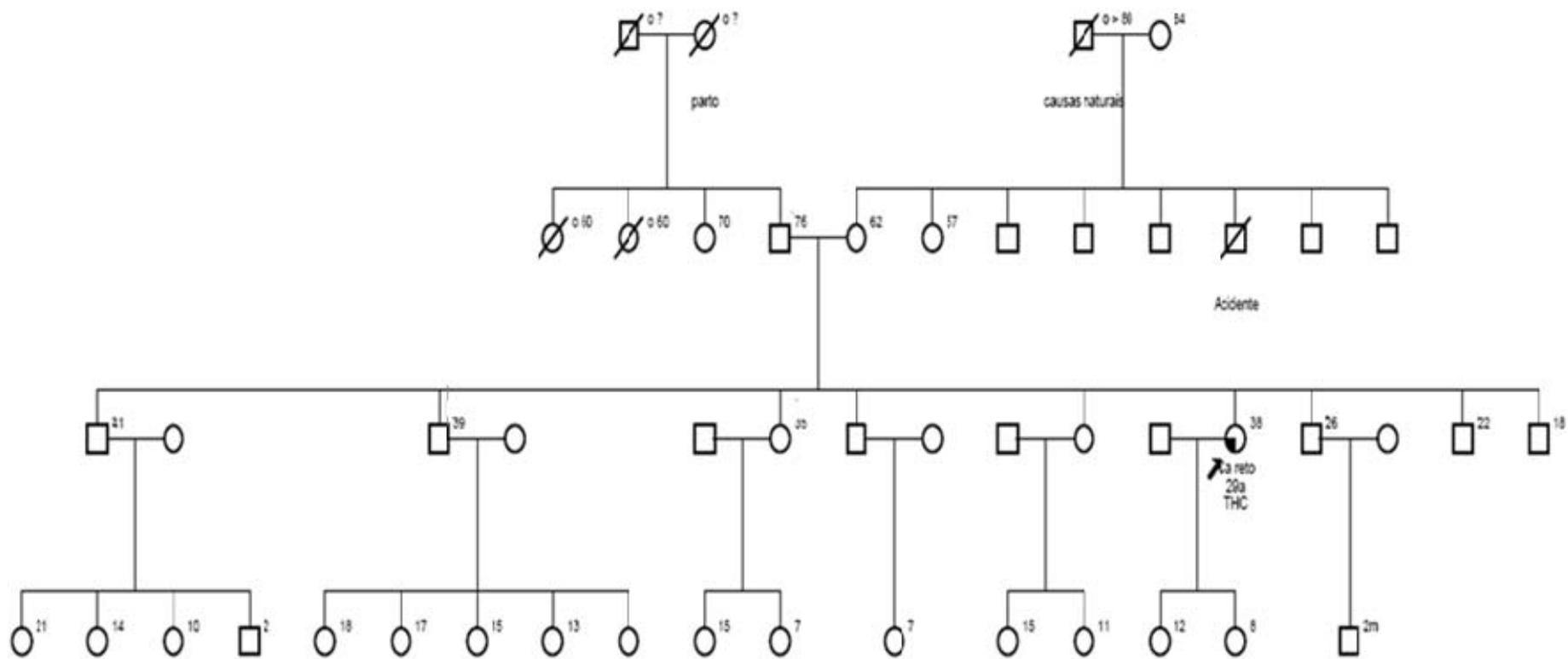
Relato médico

THC

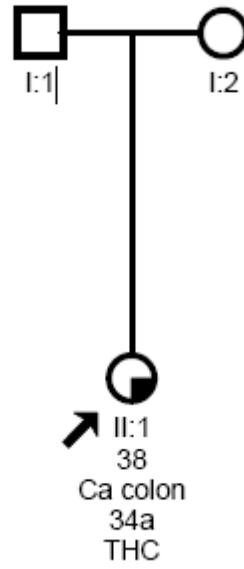
Tratado no hospital ACCamargo

Ca

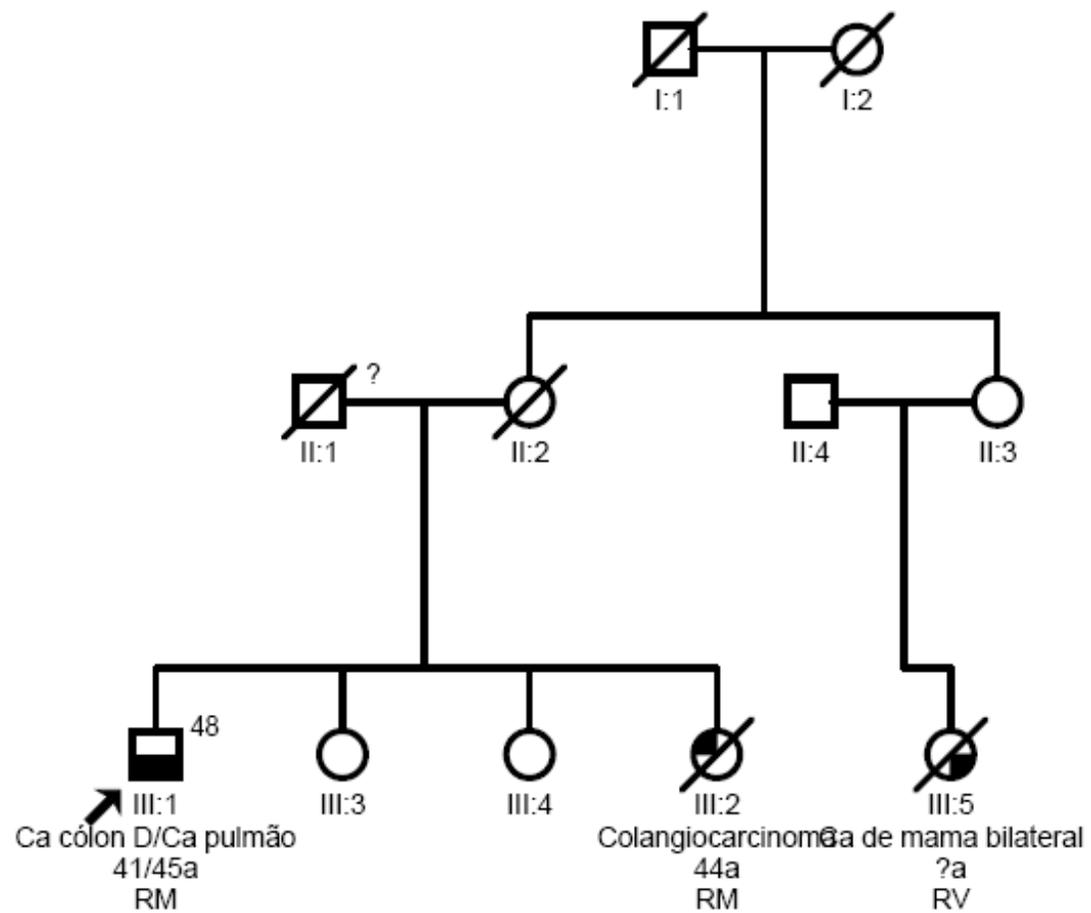
Câncer



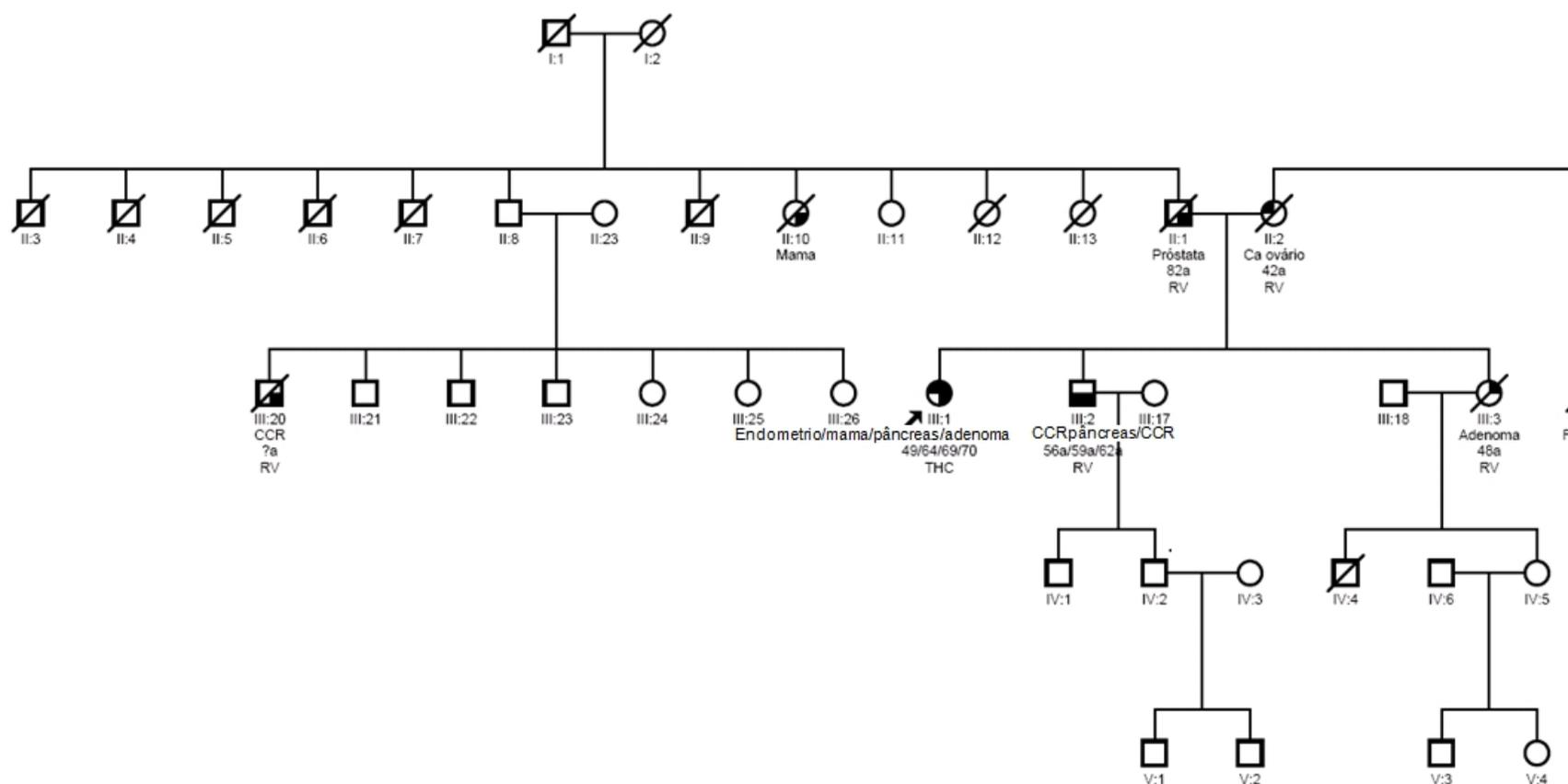
Heredograma do paciente SL-013



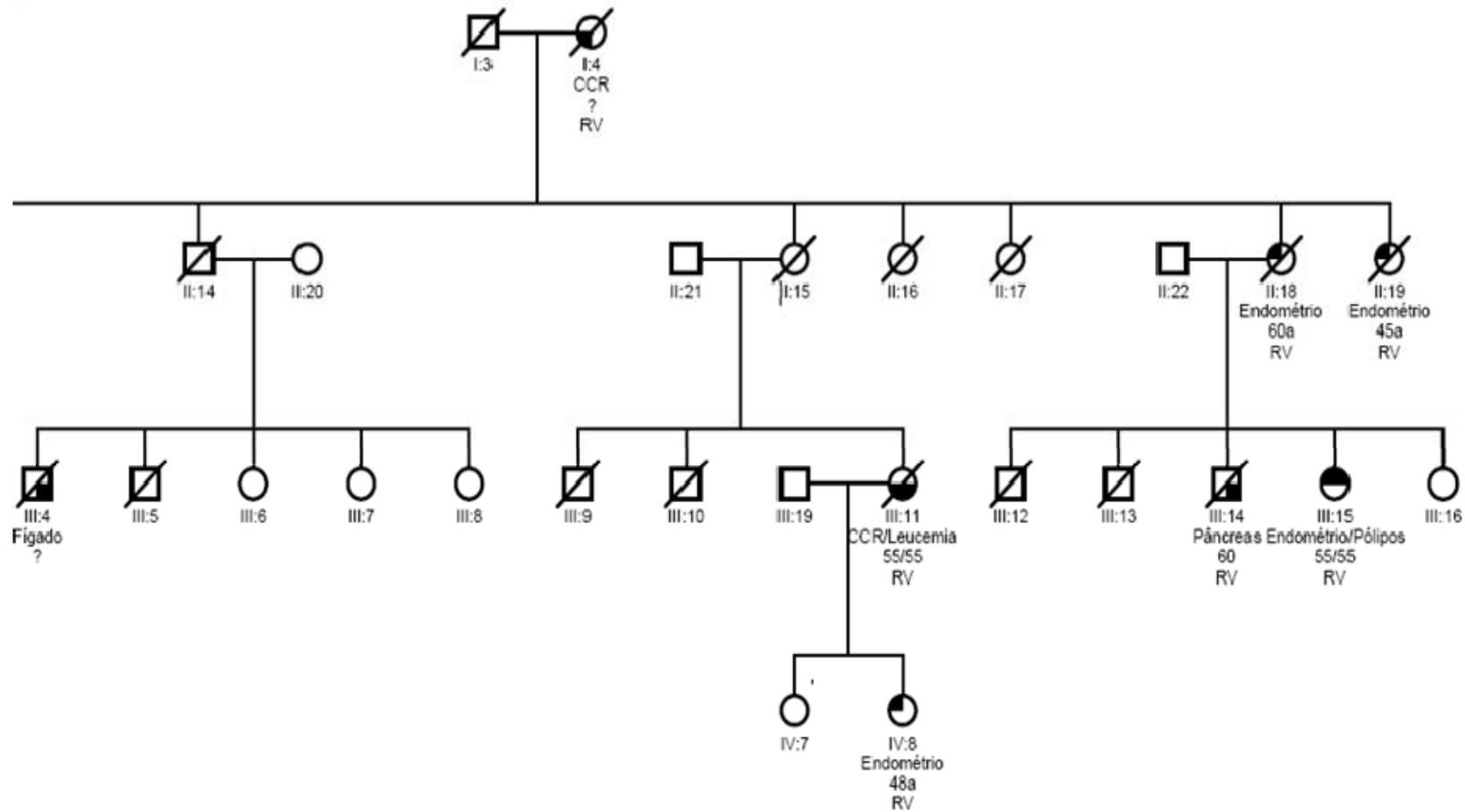
Heredograma do paciente SL-023



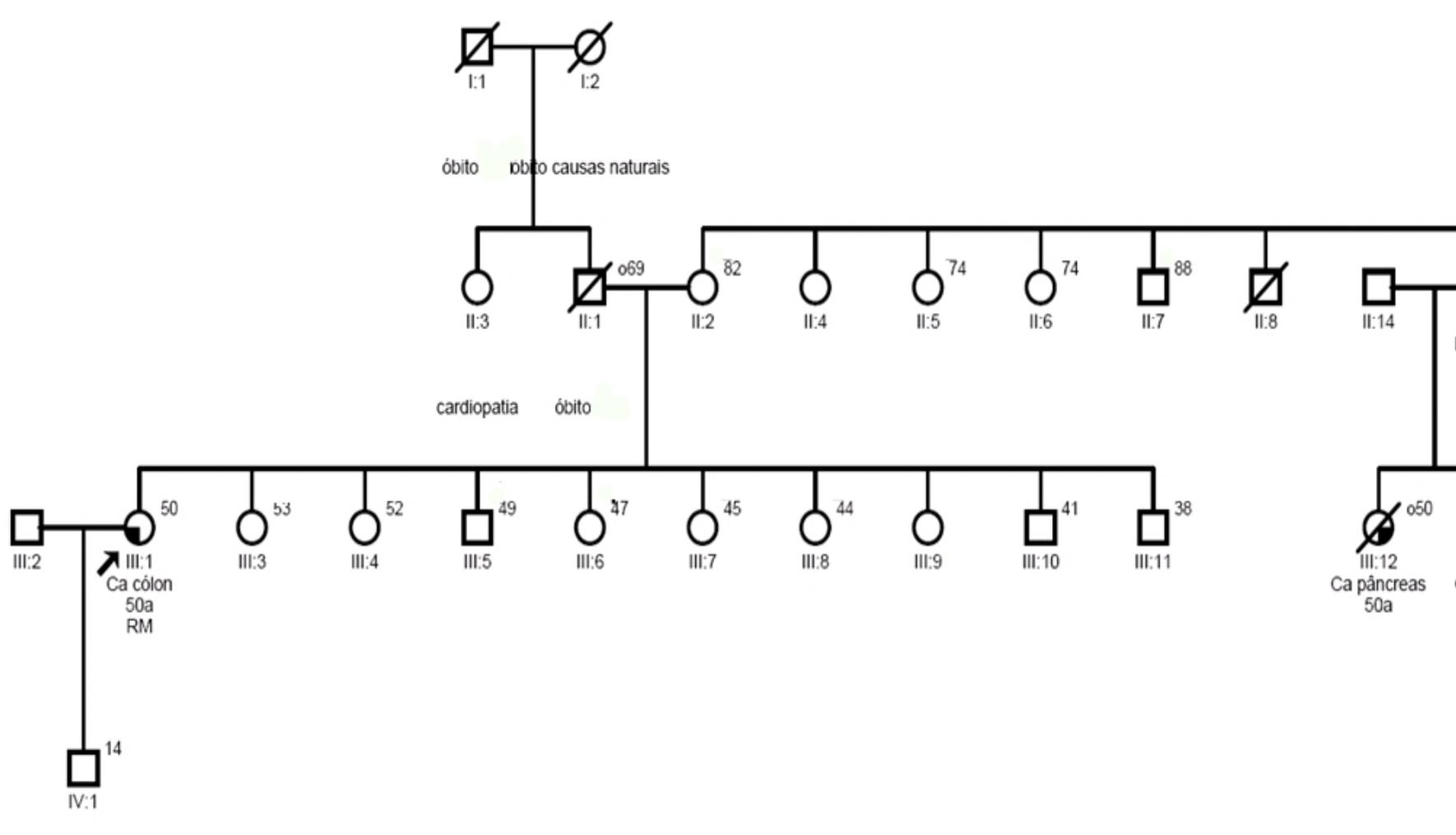
Heredograma do paciente SL-030



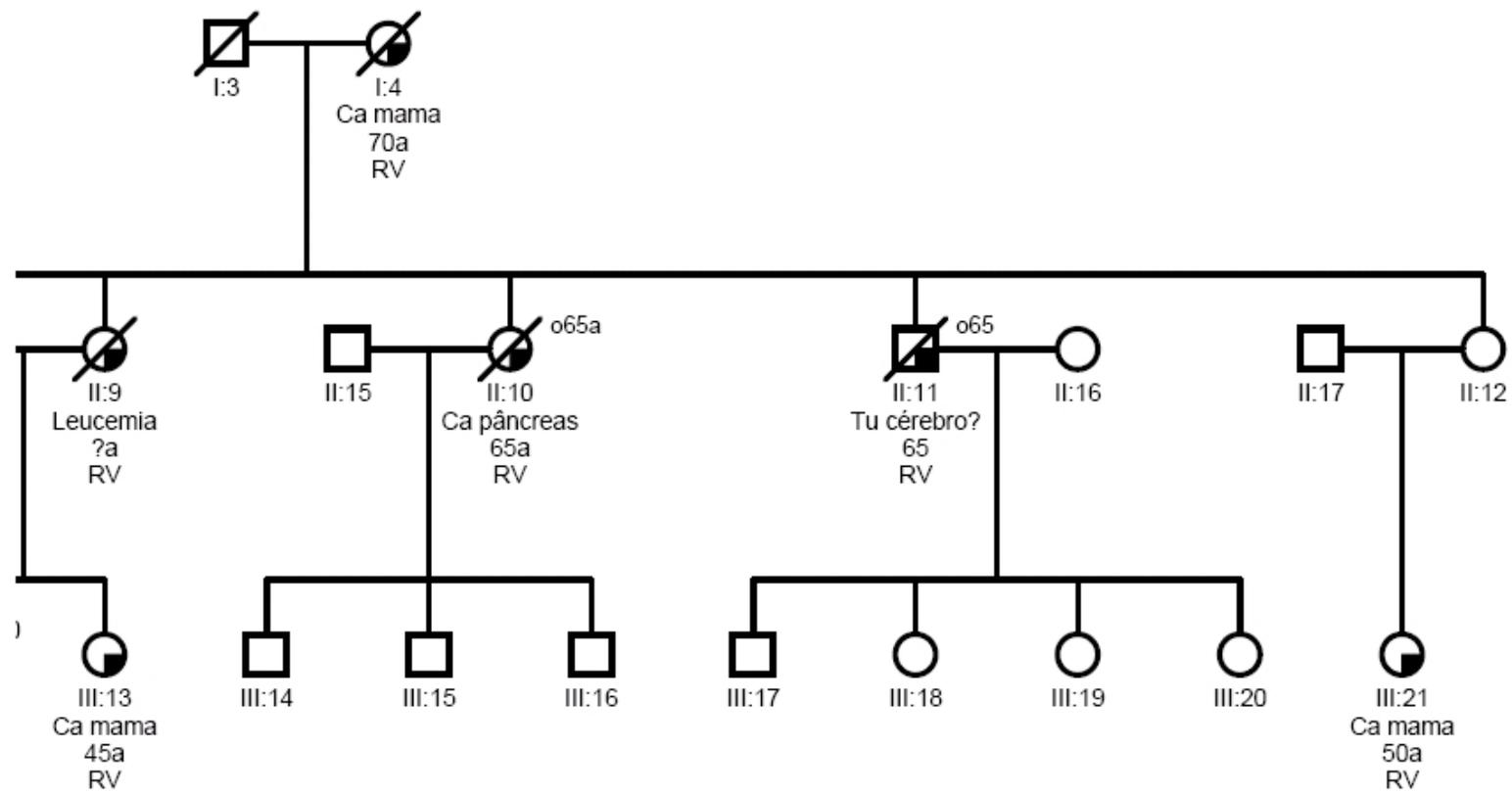
Heredograma do paciente SL-047



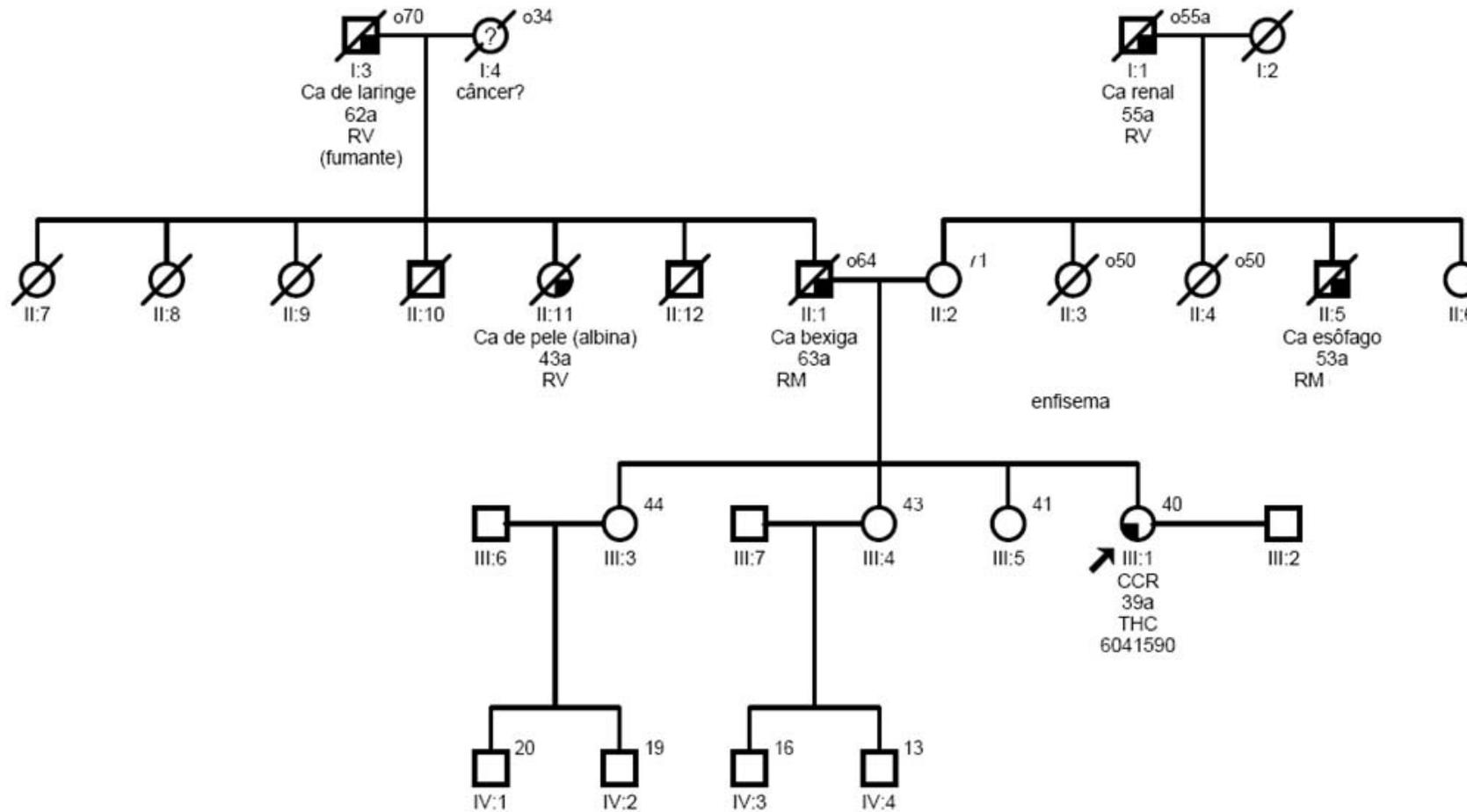
Heredograma do paciente SL-047



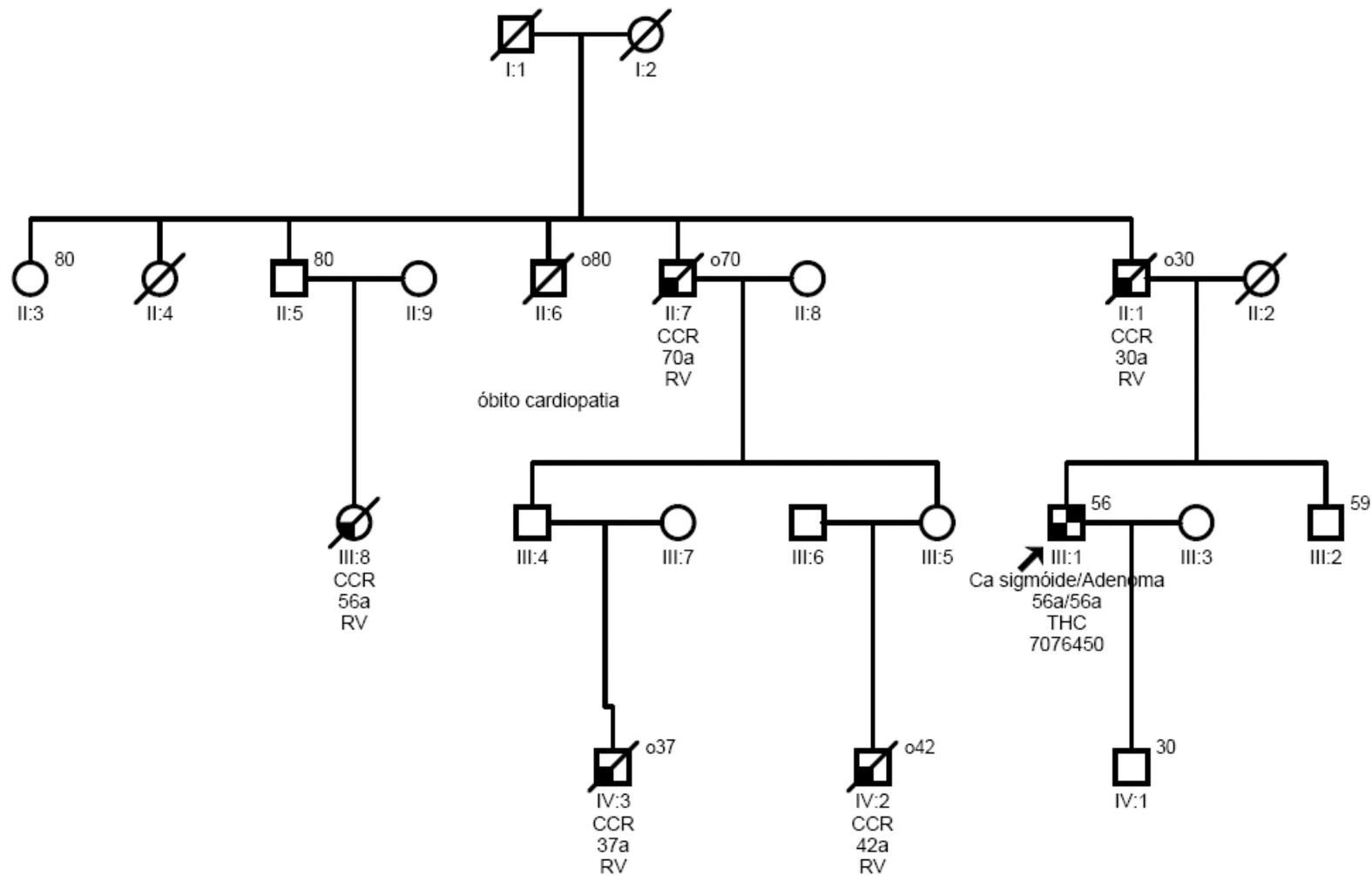
Heredograma do paciente SL-050



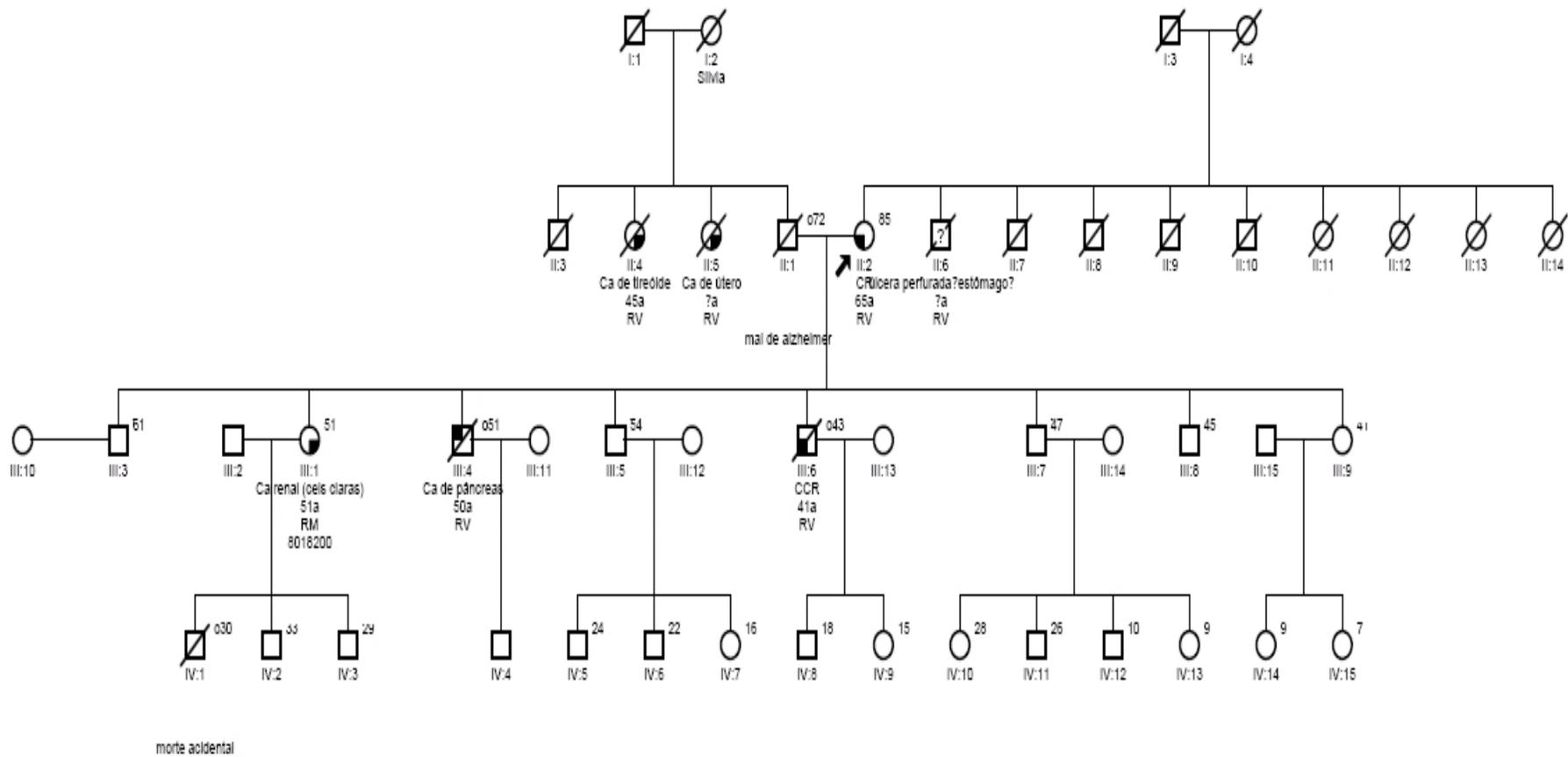
Heredograma do paciente SL-050



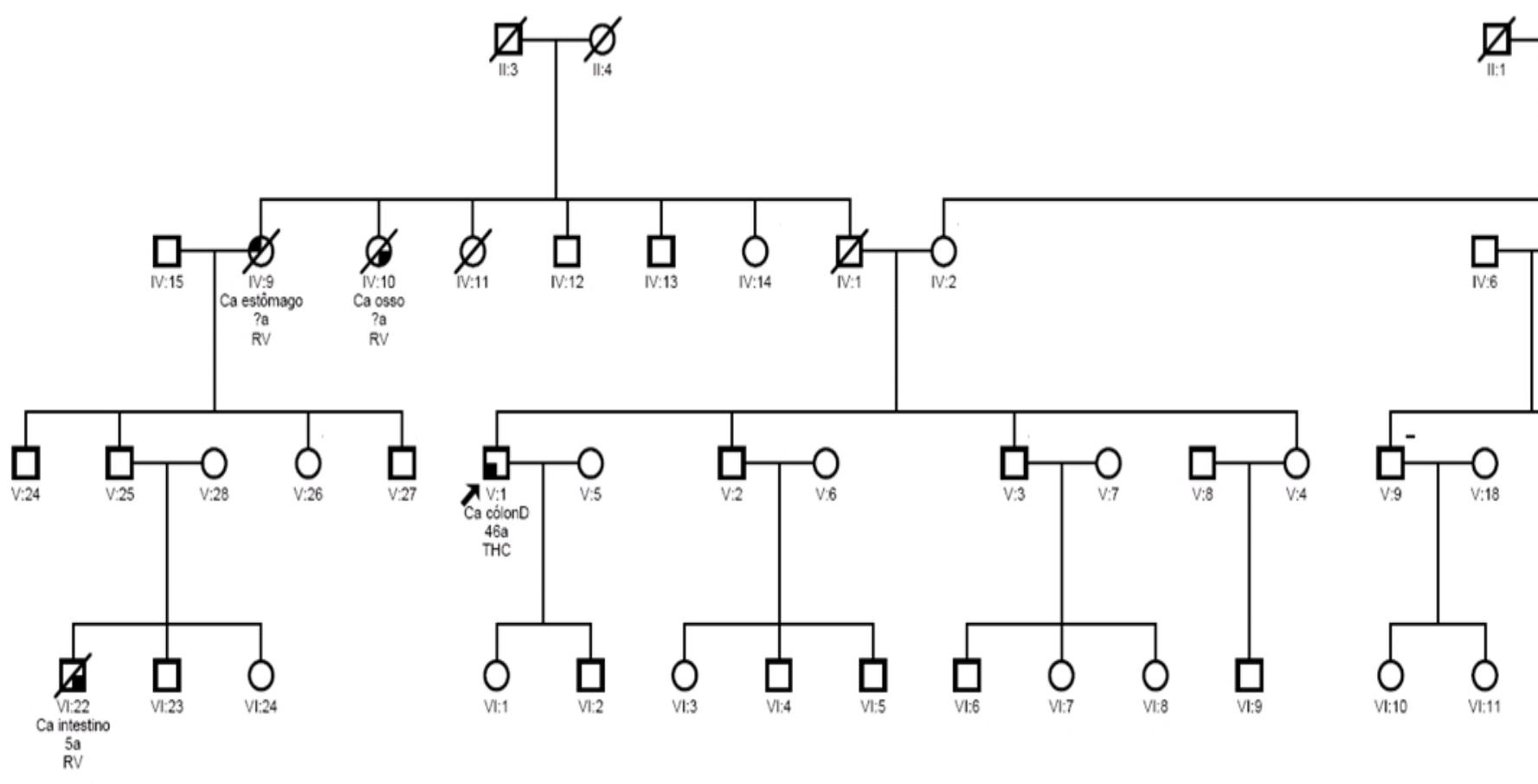
Heredograma do paciente SL-060



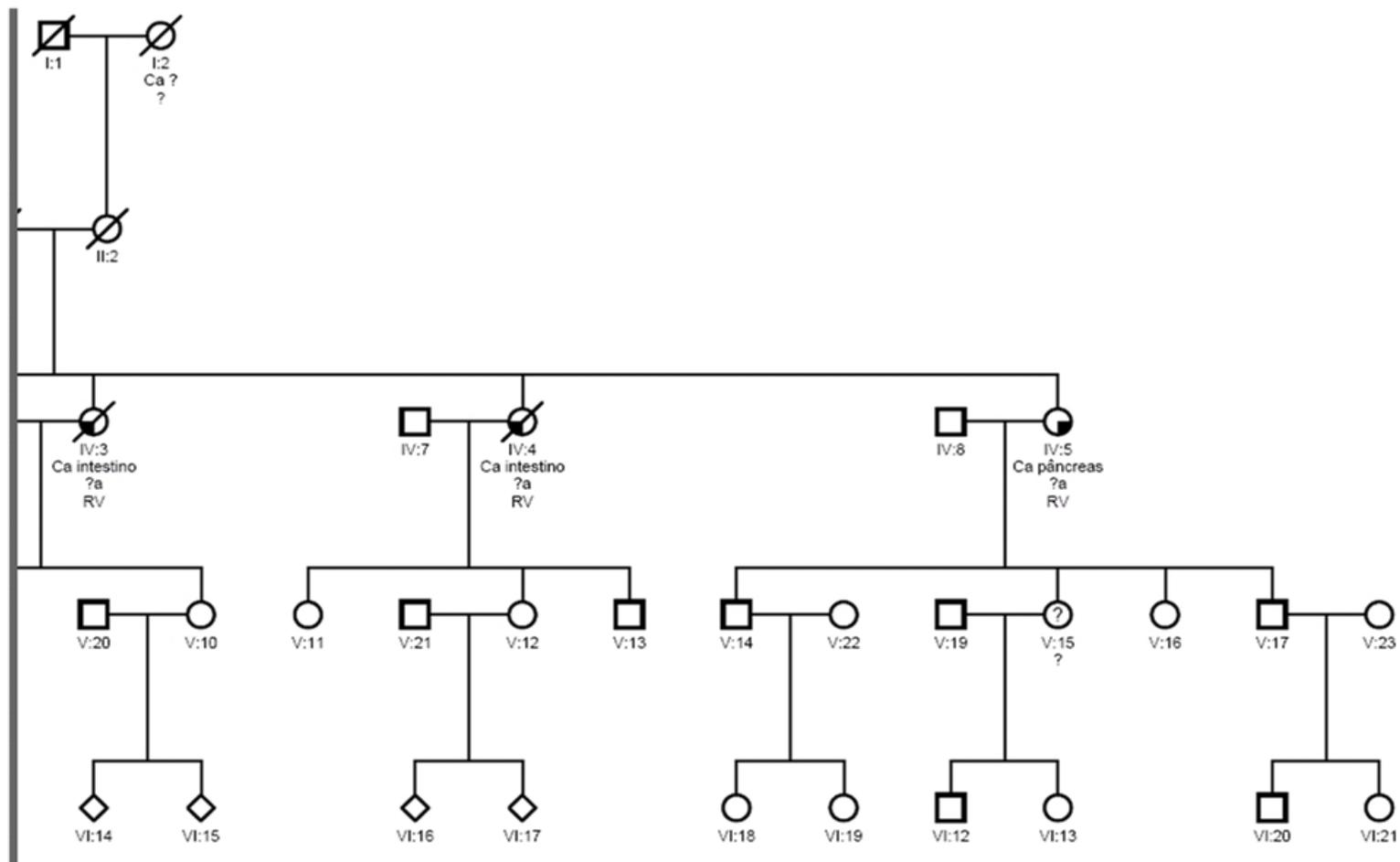
Heredograma do paciente SL-061



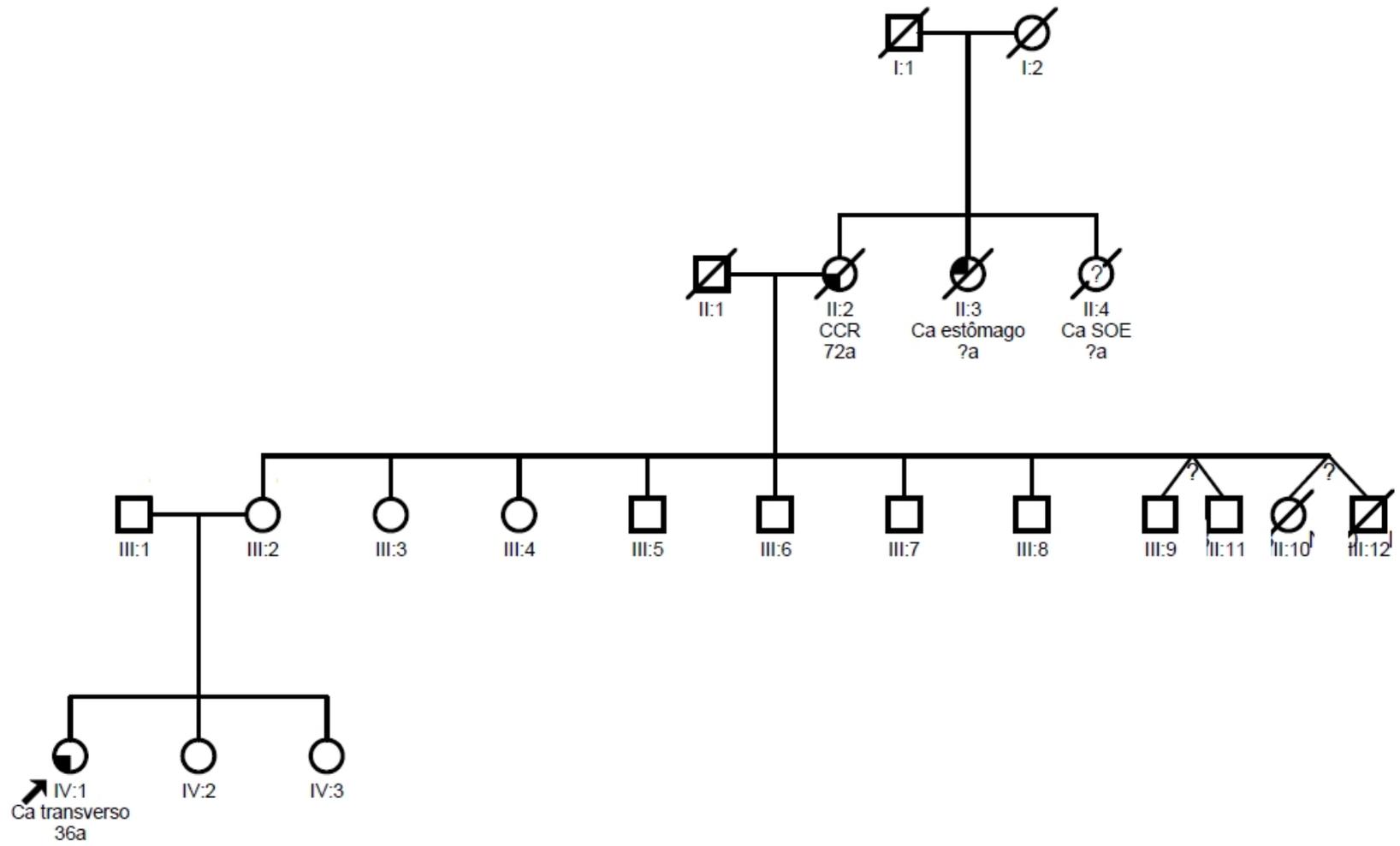
Heredograma do paciente SL-062



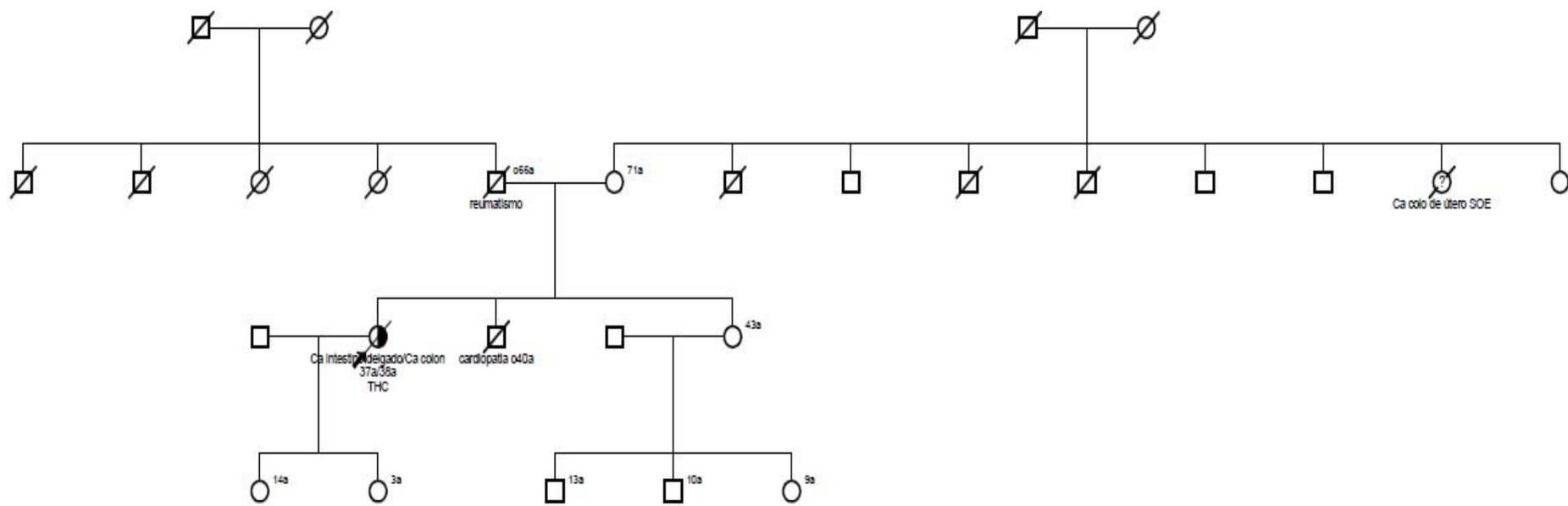
Heredograma do paciente SL-067



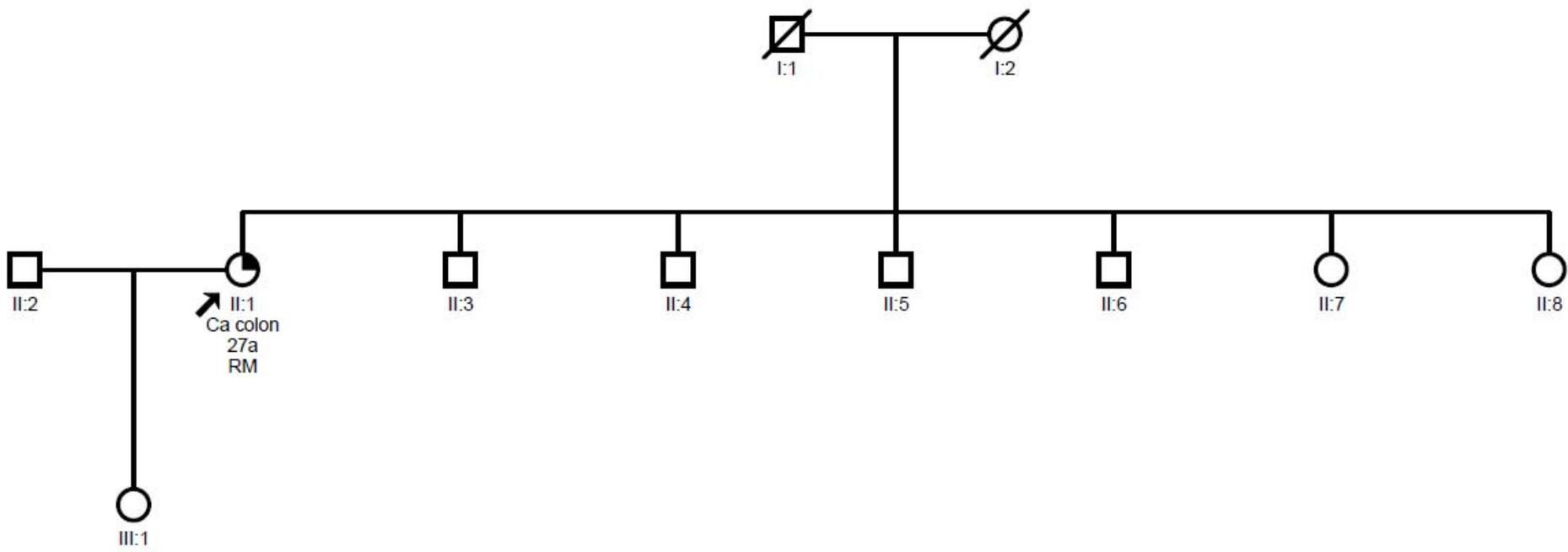
Heredograma do paciente SL-067



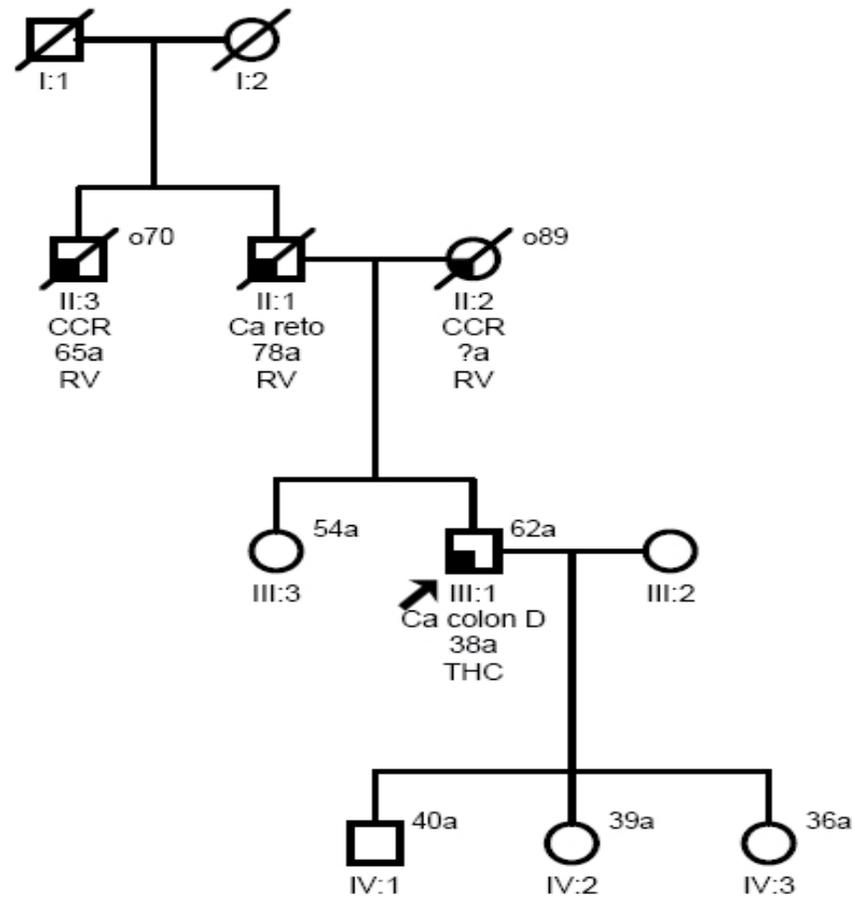
Heredograma do paciente SL-069



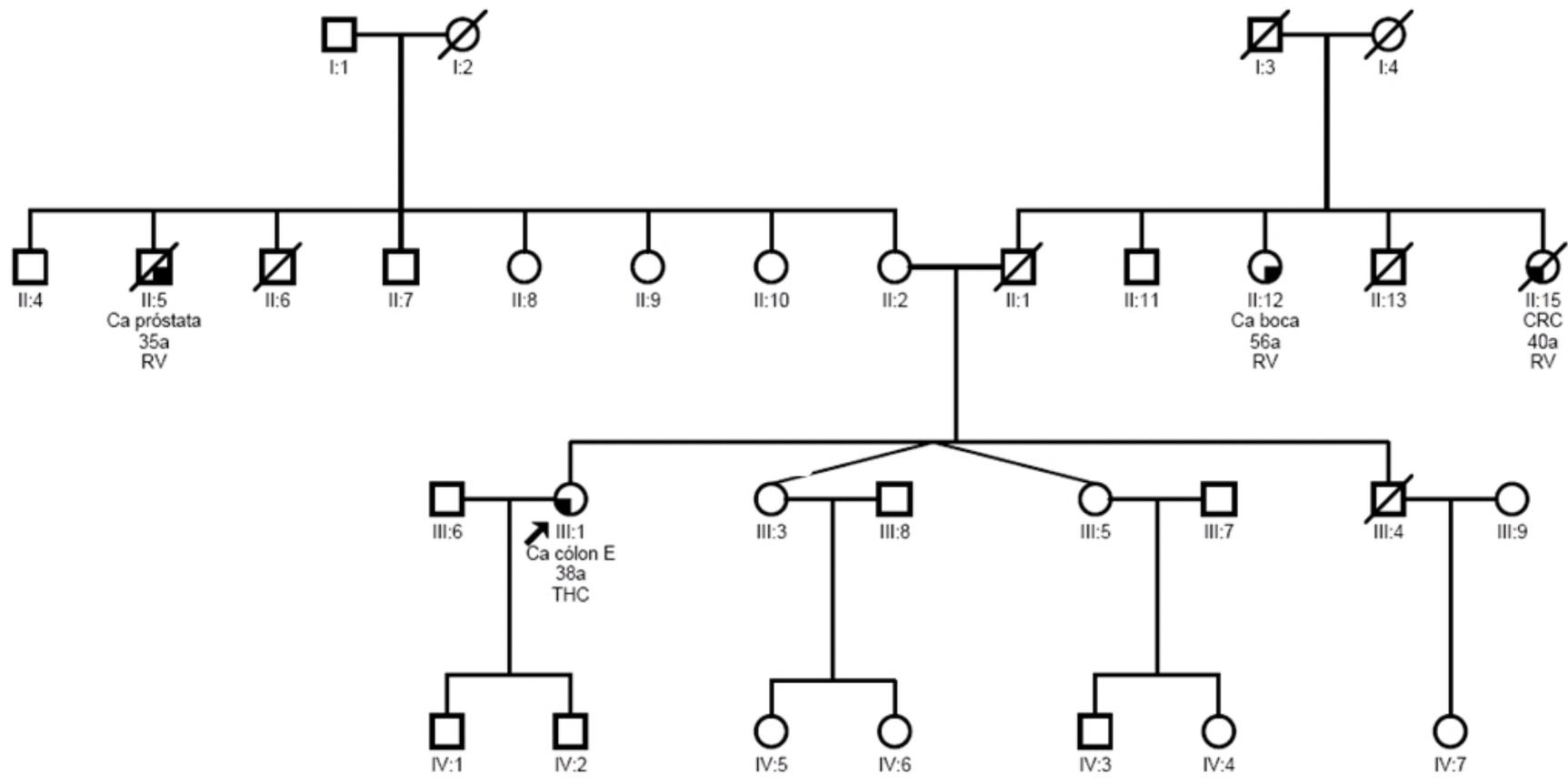
Heredograma do paciente SL-074



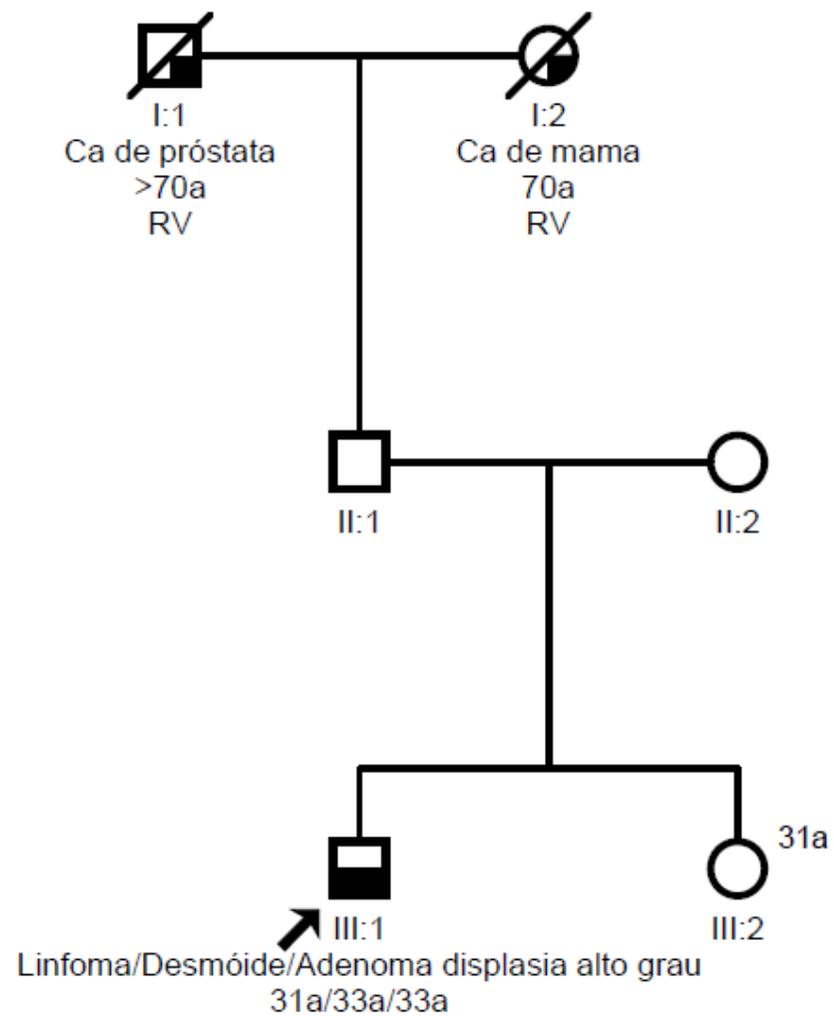
Heredograma do paciente SL-078



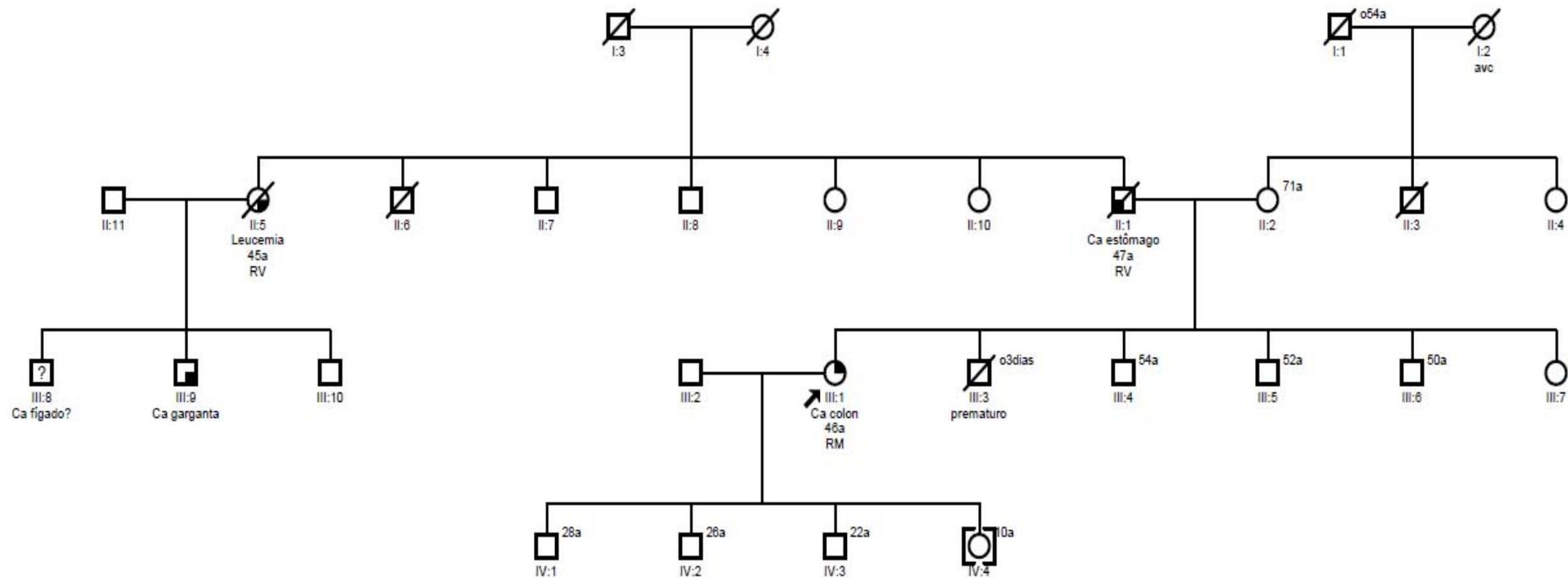
Heredograma do paciente SL-083



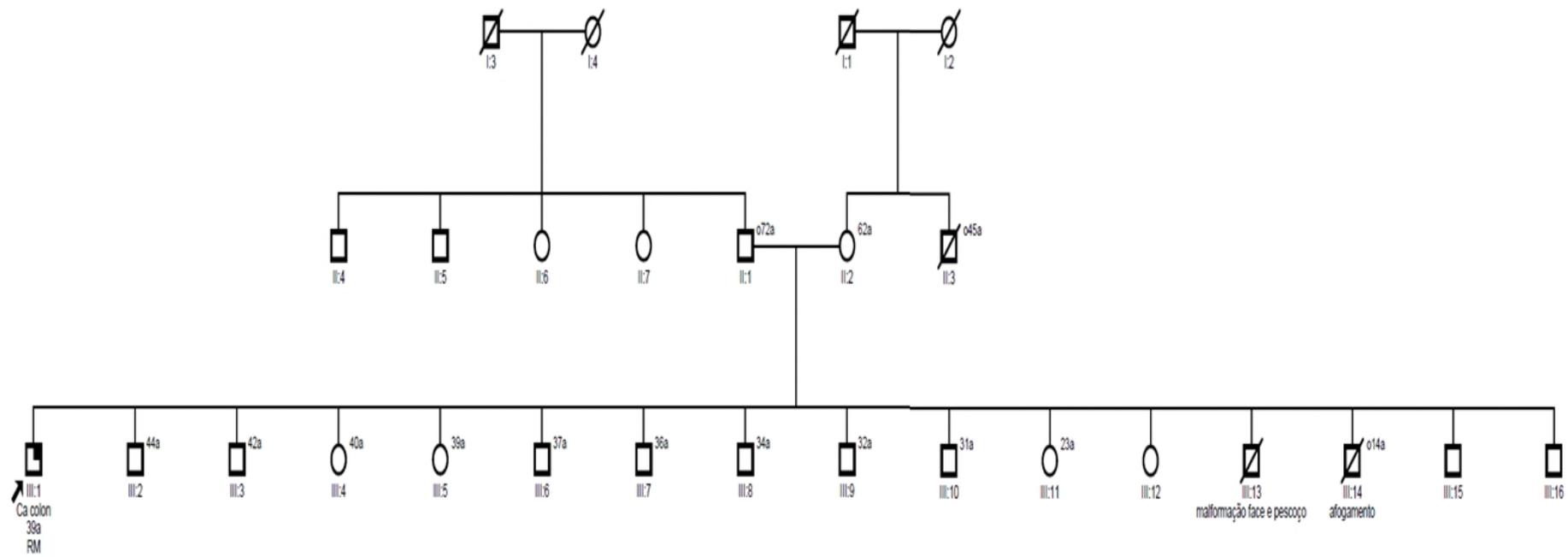
Heredograma do paciente SL-085



Heredograma do Paciente SL-088



Heredograma do paciente SL-2-7



Heredograma do paciente SL-2-13