

A.C CAMARGO CANCER CENTER

Fundação Antônio Prudente Área de Oncologia

THAINÁ MARIA RODRIGUES NASCIMENTO

**MECANISMOS SOMÁTICOS E GERMINATIVOS RAROS EM PACIENTES
COM DEFICIÊNCIA INEXPLICADA DE *MISMATCH REPAIR* (MMR)**

Nível: apresentado ao Programa de
Mestrado Acadêmico da Fundação
Antônio Prudente, como requisito
para obtenção do título de Mestre
em Ciências da Saúde. Área de
concentração: Genômica.

Orientador: Giovana Tardin
Torrezan

SÃO PAULO

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Nascimento, Thainá Maria Rodrigues.

Mecanismos somáticos e germinativos raros em pacientes com deficiência inexplicada de mismatch repair (MMR). / Thainá Maria Rodrigues Nascimento. São Paulo, 2025.

65f.

**Dissertação de Mestrado - Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.**

Orientador: Giovana Tardin Torrezan.

1. Câncer colorretal, 2. Síndrome de Lynch, 3. u-dMMR

CDU 616

Elaboração eletrônica pela Biblioteca A.C.Camargo – Fundação Antônio Prudente.
Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenização cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Nome: Thainá Maria Rodrigues Nascimento

Título: Mecanismos somáticos e germinativos raros em pacientes com deficiência inexplicada de *mismatch repair* (MMR)

Aprovado em: 24/11/2025

Banca Examinadora

Orientador: Dra. Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Fundação Antônio Prudente (A.C.Camargo Cancer Center)

Membro da banca: Dra. Louise de Brot Andrade

Instituição: Fundação Antônio Prudente (A.C.Camargo Cancer Center)

Membro da banca: Dra. Mariana Petaccia de Macedo

Instituição: Rede D'Or de São Luis

Membro da banca: Dr. Gabriel de Souza Macedo

Instituição: Hospital de Clinicas de Porto Alegre

SUPORTE Á PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do INCT 2014 de Oncogenômica e Inovação Terapêutica (Processo nº 201450943-1), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) (Processo nº 2014/509443-1) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Processo nº 465682/2014).

*“Se ao menos o medo me fizesse recuar,
pelo contrário, avanço mais e mais na
mesma proporção desse medo. É como se
o medo fosse uma coragem ao contrário.”*

Conceição Evaristo.

AGRADECIMENTOS

A realização deste trabalho materializa um sonho que só foi possível graças à contribuição direta e indireta de muitas pessoas, às quais quero agradecer profundamente. Em primeiro lugar, à minha orientadora, Dra. Giovana Tardin Torrezan, que guiou esse caminho de forma tão humana e sábia, inspirando-me e motivando-me a cada encontro, reunião e apresentação. Apesar de não ter sido uma trajetória fácil, sob sua orientação foi possível encarar os desafios com entusiasmo. Muito obrigada.

Agradeço também aos integrantes do grupo que, com paciência e amorosidade, me ensinaram a ser resiliente. Cada dica e cada aprendizado me fortaleceram nesse processo e me proporcionaram segurança por fazer parte de um grupo com tantas qualidades e talentos. Agradeço, em especial, à Larissa, por sua dedicação e genuinidade, abrindo mão até mesmo dos seus dias livres para me auxiliar e me ensinar protocolos antes inalcançáveis.

Agradeço a todos os pesquisadores e funcionários da instituição, que foram sempre solícitos e atenciosos em ajudar nos momentos necessários — às meninas do Biobanco e a toda a equipe de Anatomia Patológica, por corresponderem prontamente e agilizarem todos os pedidos de extração de DNA.

Agradeço também aos meus pais, Fátima e Roberto, e ao meu irmão, Rafael, por todos os estímulos, incentivos e apoio durante minha trajetória acadêmica. Vocês são a base do meu desejo de ser melhor e de contribuir para um mundo melhor.

Não poderia deixar de mencionar meus amigos que me acompanharam nesta jornada, incentivando-me e cuidando para que eu não desistisse dos meus sonhos. É também por vocês que hoje posso redigir estes agradecimentos. O apoio de vocês foi tão essencial quanto respirar. Muito obrigada, Elisangela, Thayna e Rodrigo.

Ao meu amor, Kauê, obrigada por dividir a vida comigo e por todas as vezes em que segurou minha mão nos momentos mais difíceis, tornando possível enfrentá-los. Você é fundamental e me fez sentir capaz de realizar este sonho.

RESUMO

NASCIMENTO, Thainá Maria Rodrigues. **Mecanismos somáticos e germinativos raros em pacientes com deficiência inexplicada de mismatch repair (MMR)**. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introdução: A deficiência de *mismatch repair* (dMMR) é causada pela inativação dos genes de MMR (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*), levando à ausência de uma ou mais das quatro proteínas MMR por imuno-histoquímica (IHQ) e à instabilidade de microssatélites (MSI). Alguns pacientes apresentam tumores dMMR na ausência de variante germinativa patogênica (VGP) detectável nos genes MMR ou de metilação somática no promotor de *MLH1* e mutação de *BRAF*. Esses casos compreendem um grupo chamado de dMMR inexplicada (u-dMMR), também conhecido como síndrome de Lynch-like. Estudos recentes evidenciaram que mais da metade dos pacientes com u-dMMR apresentam causas somáticas de dMMR (como mutações somáticas em algum gene MMR). Uma pequena parcela desses pacientes apresenta VGP complexas nos genes MMR, que não são identificadas nos testes germinativos padrão (como alterações intrônicas profundas ou inversões gênicas), e um terço permanecem com causas indefinidas. A identificação das causas de u-dMMR apresenta implicações clínicas para o manejo do paciente e seus familiares e o desenvolvimento de estratégias eficientes para caracterizar esses casos é necessário. **Objetivo:** Identificar casos dMMR sem alterações germinativas em MMR; avaliar a frequência de causas somáticas de dMMR através da análise de metilação do promotor de *MLH1*, de mutação do gene *BRAF* (V600E) e do sequenciamento somático dos genes MMR; avaliar a frequência de alterações germinativas complexas que levem u-dMMR através de sequenciamento de RNA constitutivo. **Metodologia:** Foram selecionados pacientes com câncer colorretal (CCR), câncer de endométrio (CE) ou câncer gástrico (CG) com tumores dMMR identificados na rotina diagnóstica do A.C.Camargo Cancer Center ou em estudos anteriores, com padrão de perda na IHQ conhecida. Para os casos com perda de *MLH1*/*PMS2*, foram realizadas de forma escalonada análises de metilação do promotor de *MLH1* (todos os tumores), mutação em *BRAF* (somente CCR) e sequenciamento somático dos genes MMR. Para os casos com perda de *PMS2* isolado, *MSH2* e/ou *MSH6* foi realizado o sequenciamento somático dos genes MMR. Para casos negativos para alterações somáticas, realizou-se o sequenciamento de RNA constitutivo. **Resultados:** Identificamos 50 casos de pacientes com tumores dMMR e teste genético germinativo negativo, sendo eles 33 casos de CCR, 14 de CE e 3 de CG. A causa mais frequente de dMMR foi a perda *MLH1*/*PMS2* (76%), seguida por *MSH2*/*MSH6* (14%), *PMS2* (4%), *MSH6* (4%) e um caso apresentou perda concomitante de *MLH1*/*PMS2* e *MSH6* (2%). As análises de metilação de *MLH1* e mutação de *BRAF* foram realizadas para 30 casos com perda de *MLH1*/*PMS2*, sendo que 6 (20%) foram negativos para ambos os marcadores e foram considerados u-dMMR. A análise de sequenciamento somático foi realizada em 14 pacientes, e em 8/13 (61%) casos com resultados

satisfatórios foram detectadas mutações mono ou bialélicas nos genes MMR esperados. Cinco pacientes foram negativos para mutações somáticas nos genes correspondentes a imunohistoquímica, e destes, 3 foram avaliados por sequenciamento de RNA germinativo. Nesses casos, não foram identificados eventos de *splicing* significativos. **Conclusão:** A utilização de múltiplos testes moleculares, como os realizados nesse trabalho, é importante para a determinação das causas de u-dMMR e identificação de tumores esporádicos, sendo que mutações somáticas nos genes MMR explicam 61% dos casos. Essa identificação é importante, pois, auxilia no manejo dos pacientes, diminuindo as etapas de investigação clínica e possibilitando o correto aconselhamento genético e seguimento clínico.

Palavras-chaves: Câncer colorretal, síndrome de Lynch, u-dMMR, mutação somática, variante germinativa.

ABSTRACT

NASCIMENTO, Thainá Maria Rodrigues. Rare somatic and germline mechanisms in patients with unexplained mismatch repair (MMR) deficiency. Dissertation. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025

Introduction: Mismatch repair deficiency (dMMR) is caused by inactivation of the MMR genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2*), leading to loss of one or more of the four MMR proteins by immunohistochemistry (IHC) and to microsatellite instability (MSI). Some patients present dMMR tumors without a detectable germline pathogenic variant (GPV) in MMR genes or somatic *MLH1* promoter methylation and *BRAF* mutation. These cases comprise a group termed unexplained dMMR (u-dMMR), also known as Lynch-like syndrome. Recent studies have shown that more than half of u-dMMR patients have somatic causes of dMMR (such as somatic mutations in an MMR gene). A small subset harbors complex GPVs in MMR genes that are not identified by standard germline testing (e.g., deep intronic alterations or gene inversions), and about one-third remain without a defined cause. Identifying the causes of u-dMMR has clinical implications for managing patients and their families, and developing efficient strategies to characterize these cases is necessary. **Objective:** To identify dMMR cases without germline alterations in MMR; to assess the frequency of somatic causes of dMMR through *MLH1* promoter methylation analysis, *BRAF* p.V600E mutation testing, and tumor (somatic) sequencing of MMR genes; and to evaluate the frequency of complex germline alterations underlying u-dMMR by constitutive (germline) RNA sequencing. **Methods:** We selected patients with colorectal cancer (CRC), endometrial cancer (EC), or gastric cancer (GC) with dMMR tumors identified in routine diagnostics at the A.C.Camargo Cancer Center or in prior studies, with a known IHC loss pattern. For cases with *MLH1*/*PMS2* loss, we performed stepwise testing with *MLH1* promoter methylation (all tumors), *BRAF* mutation analysis (CRC only), and somatic sequencing of MMR genes. For cases with isolated *PMS2* loss or loss of *MSH2* and/or *MSH6*, we performed somatic sequencing of MMR genes. For cases negative for somatic alterations, constitutive (germline) RNA sequencing was planned. **Results:** We identified 50 patients with dMMR tumors and negative germline genetic testing: 33 CRC, 14 EC, and 3 GC. The most frequent dMMR pattern was *MLH1*/*PMS2* loss (76%), followed by *MSH2*/*MSH6* (14%), isolated *PMS2* (4%), isolated *MSH6* (4%), and one case with concomitant *MLH1*/*PMS2* and *MSH6* loss (2%). *MLH1* methylation and *BRAF* testing were performed in 30 cases with *MLH1*/*PMS2* loss; six (20%) were negative for both markers and were considered u-dMMR. Somatic sequencing was performed in 14 patients; among the 13 with satisfactory results, mono- or biallelic mutations in the expected MMR genes were detected in 8 cases (61%; 8/13). Five patients were negative for somatic mutations in the MMR genes corresponding to the IHC loss; of these, three underwent

germline RNA sequencing, and no significant splicing events were identified. **Conclusion:** The use of multiple molecular assays, as implemented in this study, is essential to determine the causes of u-dMMR and to identify sporadic tumors, with somatic mutations in MMR genes explaining 61% of cases. This etiologic clarification is clinically important because it aids patient management, shortens diagnostic work-ups, and enables appropriate genetic counseling and clinical follow-up.

Keywords: Colorectal cancer, Lynch syndrome, u-dMMR, somatic mutation, germline variant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - As três principais vias moleculares do câncer colorretal.....	14
Figura 2 – Processo de reparo de incompatibilidade (MMR).....	18
Figura 3 – Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal.....	21
Figura 4 – Caminho para investigação de reparo de incompatibilidade (MMR) e/ou instabilidade de microssatélites em cânceres colorretais.....	24
Figura 5 – Desenho do estudo e panorama das análises a serem realizadas.....	29
Figura 6 – Distribuição dos tumores selecionados para investigação de deficiência no sistema de reparo de DNA (dMMR).....	36
Figura 7 – Heredograma	37
Figura 8 – Fluxograma.....	38
Figura 9 – Visualização do resultado de avaliação do sequenciamento do promotor de <i>MLH1</i> e <i>BRAF</i>	40
Figura 10 – Distribuição da idade dos pacientes por grupo com deficiência MMR.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Definição de instabilidade de microssatélites (MSI) e deficiência de reparo de incompatibilidade (dMMR).....	19
Tabela 2 - Análise da metilação do promotor de <i>MLH1</i> em tumores CCR, CE e CG, com avaliação concomitante da mutação <i>BRAF</i> (V600E) nos casos de CCR, em tumores com perda de expressão de <i>MLH1/PMS2</i> por IHQ.....	41
Tabela 3 – Resultados do sequenciamento somático das amostras com perda inexplicada das proteínas do sistema MMR.....	48
Tabela 4 – Informações e métricas do sequenciamento de RNA	49

LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer Colorretal
CGP	<i>Comprehensive genomic profiling</i>
CNV	Variação de número de cópias (do inglês Copy number variation)
CIMP	<i>CpG Island methylator phenotype</i>
dMMR	Deficiência dos genes de <i>mismatch repair</i>
pMMR	Proficiência dos genes de <i>mismatch repair</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
Ensp	Escola Nacional de Saúde Pública
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina (do inglês <i>formalin fixed paraffin embedded</i>)
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
IDH	Índice de desenvolvimento humano
IHQ	Imunohistoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Indels	Inserções/deleções
MAP	Polipose associada ao gene <i>MUTYH</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MS	Microsatélites
MSI	Instabilidade de microsatélites
MSI-H	Instabilidade de microsatélites alta
MSI-L	Instabilidade de microsatélites baixa
MSS	Regiões de microsatélites estáveis
NGS	Sequenciamento de nova geração
NIC	Tumores com instabilidade cromossômica
RNA	Ácido ribonucleico
SL	Síndrome de Lynch
SLL	Síndrome de Lynch-Like
SPHC	Síndromes de predisposição hereditária ao câncer
TMB	<i>Tumor Mutation Burden</i>
u-dMMR	Deficiência dos genes de <i>mismatch repair</i> inexplicada
VUS	Variante de significado incerto (do inglês <i>Variants of Uncertain Significance</i>)
VGP	Variante germinativa patogênica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Sistema de reparo de incompatibilidade (MMR) e Instabilidade de Microssatélites (MSI)	16
1.2 Síndrome de Predisposição hereditária ao câncer: Síndrome de Lynch (SL)	20
1.3 Deficiência inexplicada de MMR (u-dMMR).....	23
2. OBJETIVO	27
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos	27
3 METODOLOGIA.....	28
3.1 Casuística.....	28
3.2 Extração de DNA e RNA.....	29
3.3 Análise de metilação do promotor de <i>MLH1</i>	30
3.4 Análise de mutação no gene <i>BRAF</i> (V600E).....	31
3.5 Sequenciamento somático dos genes MMR	31
3.6 Sequenciamento germinativo de RNA.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1 Caracterização dos casos com deficiência em MMR.....	34
4.2 Avaliação de metilação do promotor de <i>MLH1</i> e mutação <i>BRAF</i> V600E para identificação de casos esporádicos	39
4.3 Investigação de mutações somáticas em genes MMR	44
4.4 Investigação de mutações germinativas no rna constitutivo	50
5. DISCUSSÃO	51
6. CONCLUSÃO	59
7. REFERÊNCIAS.....	60

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR), conforme informações fornecidas pelo Instituto Nacional de Câncer (INCA), é atualmente o quarto tipo de câncer com maior incidência na população brasileira, ficando atrás apenas do câncer de pele não melanoma, do câncer de mama e do câncer de próstata, que ocupam as três primeiras posições.

Em termos de distribuição geográfica, a maior concentração de casos de câncer colorretal é observada na região Sudeste do Brasil, seguida pelas regiões Centro-Oeste e Sul, que também apresentam altas taxas de incidência. Por outro lado, as regiões Norte e Nordeste ocupam a quarta e quinta posição no ranking de incidência, com números comparativamente mais baixos, mas ainda assim significativos. Esses dados são baseados nas estimativas divulgadas pelo INCA em 2023, que refletem uma preocupação crescente com a prevalência dessa doença no país, especialmente considerando a importância de estratégias de prevenção e diagnóstico precoce para o controle do câncer colorretal.

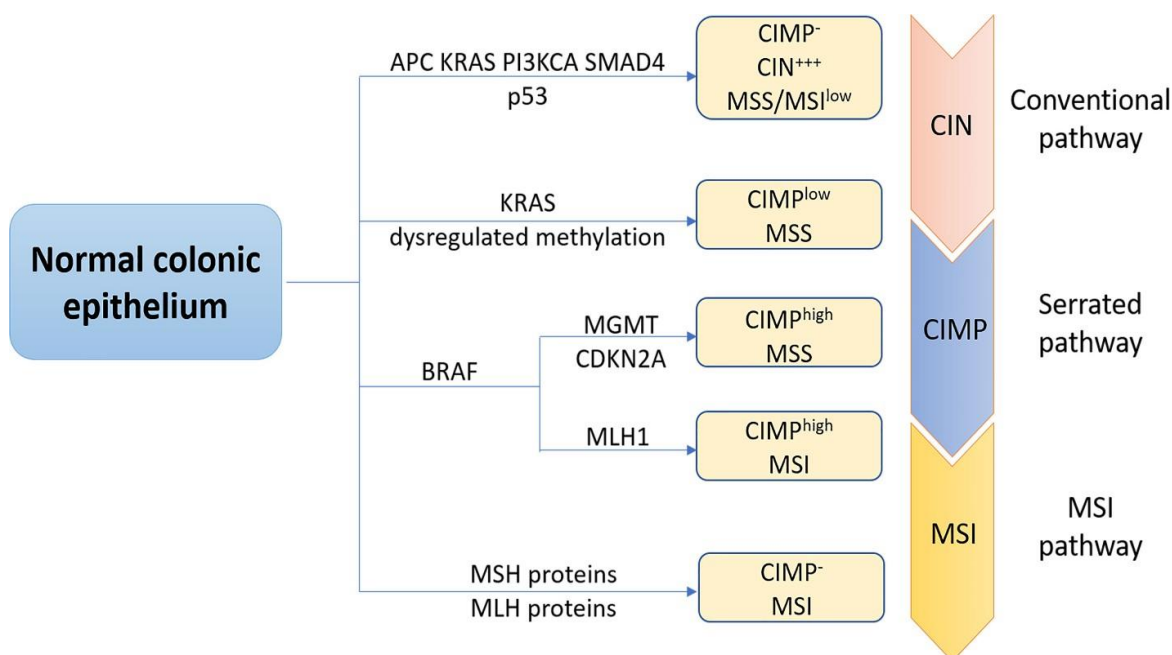
Segundo um estudo publicado pela Escola Nacional de Saúde Pública (Ensp/Fiocruz), em parceria com o INCA e a University of California San Diego, observa-se um aumento tanto na incidência quanto na mortalidade por CCR em toda a América Latina, com uma correlação direta com o índice de desenvolvimento humano (IDH) dos países da região (Muzi, et al, 2023). Esse aumento é um reflexo de mudanças no estilo de vida e nos padrões de alimentação, associados ao crescimento de fatores de risco como o sedentarismo, o consumo elevado de alimentos processados, todos fortemente vinculados ao que é conhecido como "modo de vida ocidental" e também o diagnóstico tardio da doença. O estudo também destaca a importância de promover mudanças nas políticas públicas de saúde, focadas na prevenção, no diagnóstico precoce e na adoção de hábitos saudáveis, para enfrentar o crescente desafio representado pelo câncer colorretal na região (Muzi, et al, 2023). Além dos fatores ambientais e do modo de vida, o CCR apresenta-se como um câncer heterogêneo, envolvendo múltiplas interfaces genéticas e biológicas para o seu desenvolvimento, podendo ter como origem principal causas esporádicas ou hereditárias.

O desenvolvimento do CCR esporádico está associado a múltiplos fatores, dentre eles doenças inflamatórias intestinais, estilo de vida como sedentarismo, tabagismo, dieta rica em carnes vermelhas, obesidade e consumo excessivo de álcool (Chan, Giovannucci 2010; Keum, et al, 2019). Além disso, 10% a 20% de todos os pacientes com CCR possuem um histórico familiar positivo de CCR, e ~5% de todos os casos de CCR estão

ligados a uma síndrome hereditária, detectável por testes genéticos germinativos (Keum, et al, 2019).

As vias da carcinogênese do CCR podem ser subclassificadas em três tipos principais, podendo ter alguma sobreposição: a) Tumores com instabilidade cromossômica (NIC); b) Via serrilhada; e, c) Tumores com instabilidade de microsatélites (MSI - microsatellite instability) (Keum, et al, 2019; Li, et al, 2021; Martínez-roca, et al, 2022).

Figura 1 - As três principais vias moleculares do câncer colorretal. A via convencional de instabilidade cromossômica (NIC), iniciada pela mutação *APC*, seguida por mutações em *KRAS*, *PIK3CA* e *SMAD4*. A via serrilhada, ou também, via de metilação da ilha CpG (CIMP), apresentam altos níveis de CIMP e estabilidade de microsatélites (MSS). A via MSI é uma terceira via importante do CCR causada pela disfunção dos genes de reparo de incompatibilidade (*mismatch repair* – MMR) de DNA, que codificam proteínas homólogas de Mutl e/ou MutS (MSH).



Fonte: <https://doi.org/10.3389/fonc.2022.852927>

No caso dos tumores da via NIC, ocorrem anormalidades estruturais ou alterações no número de cromossomos, geralmente precedidas por mutações pontuais de perda de função em *APC* (Grady, Carethers, 2008). Essa via corresponde a via de carcinogênese mais comum, ocorrendo em 65%–70% dos CCRs esporádicos, e as anormalidades cromossômicas podem estar associadas a um mau prognóstico. A NIC causa a progressão

do tumor aumentando as alterações genômicas, tornando o tumor mais agressivo e resistente aos medicamentos. A maioria dos tumores com NIC são estáveis em regiões de microssatélites (MSS) (Keum, et al, 2019; Martínez-roca, et al, 2022).

Entre 20% e 30% dos CCRs surgem através da via serrilhada da carcinogênese, que contempla tanto tumores MSS quanto MSI. A maioria dos pólipos serrilhados (80–90%) são lesões benignas, com apenas uma minoria desenvolvendo displasia. No entanto, após a displasia, a carcinogênese é acelerada e o CCR se desenvolve. A maioria dos tumores com fenótipo metilado em ilhas CpG (CIMP – do inglês *CpG island methylator phenotype*) são MSS ou têm MSI baixo, mas se a hipermetilação afeta o gene *MLH1*, os tumores CIMP também podem ter MSI alto (Keum, et al, 2019; Martínez-roca, et al, 2022).

A terceira via refere-se aos tumores com MSI, que ocorre em 10-15% CCR e está associada à deficiência dos genes de *mismatch repair* (dMMR) (Keum, et al, 2019; Martínez-roca, et al, 2022). Microssatélites (MS) são sequências com repetições de 1 a 5 nucleotídeos, (por exemplo, AAAAAAA... ou CACACACA.... ou similar), que estão sujeitas a erros no pareamento das bases, levando a ocorrência de inserções ou deleções durante a replicação do DNA (Keum, et al, 2019; Cerreteli, et al, 2020; Martínez-roca, et al, 2022). Esses erros são normalmente reparados por algumas enzimas reparadoras de DNA (chamadas de *mismatch repair* – MMR), e tumores que apresentam defeitos nessas enzimas acumulam uma alta taxa de alterações nos MS.

A deficiência de reparo de *mismatch repair* (dMMR) pode surgir a partir de diversos mecanismos genéticos e epigenéticos. A causa mais frequente de dMMR em tumores CCR é a hipermetilação somática de *MLH1*, que ocorre em 80% dos tumores com MSI, como consequência do CIMP. A dMMR também pode ser causada por alterações germinativas patogênicas nos genes MMR: *MLH1*, *MSH2* (e deleção do *EPCAM*), *MSH6* e *PMS2*, que são relacionadas à Síndrome de Lynch (SL), uma síndrome de predisposição ao câncer colorretal e outros tumores (Hewish, et al, 2010 Alvarez et al, 2021; Martínez-roca, et al. 2022). Ainda, alterações somáticas (não hereditárias) nos mesmos genes podem levar à dMMR.

Os genes MMR desempenham um papel crucial na manutenção da estabilidade genômica, sendo considerados genes supressores de tumor. Para que o efeito supressor de tumor desses genes seja comprometido, é necessária a perda funcional de ambos os alelos, o que está em consonância com a hipótese dos dois hits de Knudson, proposta em 1971 (Knudson AG Jr, 1971). Essa hipótese sugere que, para o desenvolvimento de um câncer,

é necessário que ocorram duas mutações sucessivas no mesmo gene supressor de tumor, sendo que nos casos dos cânceres hereditários uma delas herdada e a outra adquirida ao longo da vida. Assim, a falha na função dos genes MMR, seja por mutação hereditária ou somática, prejudica a correção de erros durante a replicação do DNA, resultando em uma instabilidade genômica que aumenta significativamente o risco de desenvolvimento de neoplasias, especialmente os cânceres que apresentam instabilidade de microssatélites (MSI). Essa relação entre a dMMR e os mecanismos de tumorigênese ilustra a importância da função reparadora dos genes MMR na prevenção do câncer e no controle da estabilidade genômica.

O CCR é a neoplasia maligna mais comum do trato gastrointestinal, caracterizada por alterações genéticas e epigenéticas que acometem as células epiteliais do cólon/ reto. Sua progressão como já relatada anteriormente, é influenciada por fatores microambientais, ambientais e comportamentais, que contribuem para a alteração do tecido saudável em tecido tumoral. Este estudo dará destaque na avaliação dos mecanismos do sistema de reparo de incompatibilidade (*mismatch repair* - MMR), investigando os mecanismos somáticos e germinativos envolvidos na inativação das principais enzimas relacionadas a esse processo.

1.1 Sistema de reparo de incompatibilidade (MMR) e Instabilidade de Microssatélites (MSI)

O sistema MMR é essencial para a manutenção da estabilidade genômica, sendo responsável pelo reconhecimento e correção de erros no DNA. A deficiência nas proteínas desse sistema pode levar à instabilidade de microssatélites (MSI), um fenômeno característico de tumores com falha no sistema MMR.

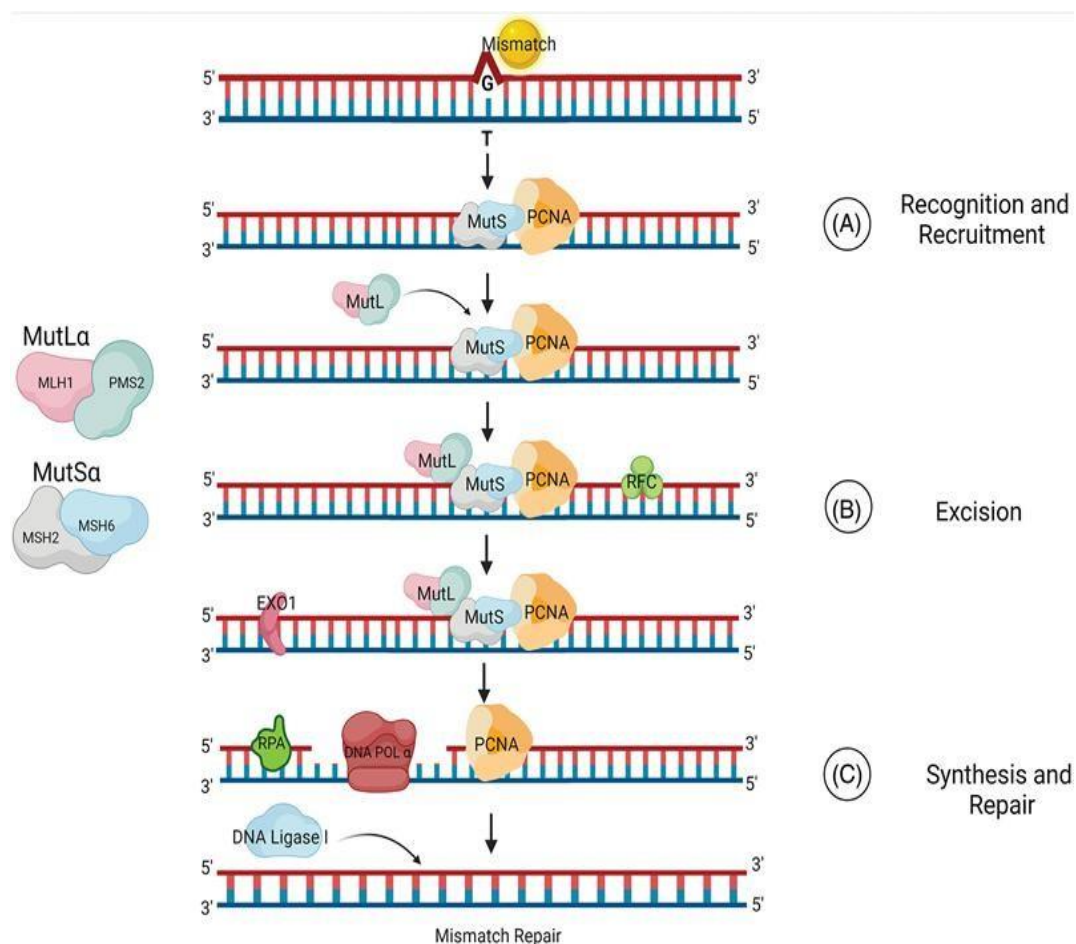
Clinicamente, pacientes com inativação do sistema MMR apresentam um número elevado de mutações em suas células tumorais, o que contribui para a instabilidade genômica. Quando essa inativação ocorre de forma hereditária, como na síndrome de Lynch (SL), ela está associada a uma predisposição significativa ao desenvolvimento de diversas neoplasias malignas, especialmente cânceres colorretais e outros tipos de tumores, como os de endométrio. A herança de variantes germinativas patogênicas (VGPs) nos genes do sistema MMR aumenta a probabilidade de falhas na reparação do DNA, resultando em uma maior carga mutacional nas células, o que favorece a carcinogênese (Olive, Graham, 2021; Martínez-roca, et al, 2022).

Este sistema é altamente conservado ao longo da evolução e desempenha um papel crucial na correção de erros de pareamento de bases. Durante a replicação do DNA, erros são comuns, e se não forem corrigidos, podem levar a alterações genômicas importantes. Além disso, danos ao DNA podem ser provocados por fatores como estresse oxidativo, peroxidação lipídica, desaminação de bases, metilação e alquilação, tornando o MMR ainda mais essencial para a manutenção da integridade genômica (Martínez- roca, et al, 2022; Olave, Graham 2021).

Quando ocorre a identificação de incompatibilidade de bases ou a inserção/deleção de bases, o complexo MutS α , formado pelas proteínas MSH2 e MSH6, reconhece a mutação, o mecanismo de excisão é realizado pelo complexo alternativo MutS β , composto pelas proteínas MSH2 e MSH3, são responsáveis pela eliminação de loops de 2 a 8 nucleotídeos. Quando ocorre a ligação do complexo MutS α na sequência incompatível, ocorre ativação da ATPase, que promove o recrutamento do complexo MutL α , formado por MLH1 e PMS2. O MutL α é responsável pelo corte da fita incompatível e sinalização para exonucleases que farão a excisão das bases mal pareadas, processo que está representado na figura a seguir (Figura 2) (Cerreteli, et al, 2020; Martínez- roca, et al, 2022; Olave, Graham, 2021).

A inativação do sistema MMR ocasiona um acúmulo de mutações em diferentes genes, incluindo genes relacionados a origem do desenvolvimento do câncer e é caracterizada pelo fenótipo tumoral de MSI e pelo aumento na taxa de mutações somáticas, levando a tumores hipermutados (Cerreteli, et al, 2020; Alvarez, et al, 2021; Olave, Graham, 2021).

Figura 2 – Processo de reparo de incompatibilidade (MMR). Organizado em três etapas principais: a) reconhecimento e recrutamento; b) excisão da parte incompatível e; c) síntese e reparo final.



Fonte: Olave, Graham, 2021, DOI: 10.1002/gcc.23015

As regiões conhecidas como microssatélites no material genético consistem em sequências repetitivas de DNA que podem incluir repetições de mono, di, tri, tetra ou pentanucleotídeos (Olave, Graham, 2021). Milhares dessas sequências estão presentes no genoma humano, distribuídas tanto em regiões codificadoras quanto em não codificadoras. Devido à sua característica repetitiva, essas sequências são mais suscetíveis a erros de incompatibilidade gerados pelo deslizamento da enzima DNA polimerase, o que as torna particularmente vulneráveis a falhas no sistema MMR (Olave, Graham, 2021). Na prática clínica, a instabilidade de microssatélites é chamada de alta (ou seja, MSI-H) quando um limite específico de instabilidade é observado dependendo do painel usado. Por exemplo, o painel Bethesda comumente usado consiste em dois *locus* de

mononucleotídeos (BAT-25 e BAT-26) e três *locus* dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250). Tumores com instabilidade de dois ou mais *locus* são considerados MSI-H e amostras com apenas um *locus* instável são classificadas como MSI “baixo” (MSI-L) já para aqueles sem instabilidade em nenhum dos cinco *locus* são considerados MSS (Olave, Graham, 2021).

O MSI-H correlaciona-se com a ausência de expressão das proteínas MMR, além de outros sinais clínicos relacionados à instabilidade de microssatélites. A Tabela 1 destaca as diferenças entre dMMR e MSI-H, um ponto que pode gerar dúvidas.

Tabela 1. Definição de instabilidade de microssatélites (MSI) e deficiência de reparo de incompatibilidade (dMMR)

MSI	dMMR
Definido como uma alteração molecular e com fenótipo hipermutado.	Definido como inativação do sistema de reparo de DNA (MMR)
Resultado de um sistema MMR defeituoso.	Dá origem ao fenômeno MSI.
Avaliado por PCR ou NGS.	Avaliado por IHQ com detecção de perda de expressão de proteínas de reparo (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)
Caracterizado por sequências de DNA repetitivas de tamanho alternado que não estão presentes no DNA da linha germinativa.	

Fonte: Tabela editada, autores Olave, Graham 2021, disponível em: <https://doi.org/10.1002/gcc.23015>

Legenda: MSI – instabilidade de microssatélite; dMMR – deficiência mismatch repair; IHQ – imuno-histoquímica.

A dMMR, portanto, é frequentemente caracterizada por instabilidade em microssatélites. A instabilidade de microssatélites pode, portanto, ser definida como um fenótipo hipermutável devido a uma deficiência no sistema MMR (dMMR) e caracterizada pela presença de sequências repetitivas de DNA de tamanho alternado (Olave, Graham, 2021).

A dMMR é causada por mutações ou deleções de *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* ou metilação do promotor *MLH1*. Ainda, grandes deleções na região 3' de *EPCAM* podem levar à perda do códon de parada para *EPCAM*, permitindo que a transcrição continue na região promotora de *MSH2* e à hipermetilação de *MSH2*, e sua consequente ausência de expressão (Olave, Graham, 2021).

Em pacientes com SL, ocorre uma variante germinativa que é seguida por um segundo evento somático. Já em pacientes com tumores que apresentam MSI, mas sem diagnóstico de SL, pode-se observar a ocorrência de dois eventos somáticos. Na maioria das vezes, isso está relacionado à hipermetilação do promotor de *MLH1*, acompanhada pela perda somática do segundo alelo. Em casos de mutações somáticas duplas, pode haver semelhanças com a síndrome de Lynch, levando à classificação como “síndrome Lynch-like”. No entanto, esse termo pode induzir a erros ao sugerir uma condição hereditária quando, na verdade, se trata de um tumor esporádico. Por essa razão, seu uso não é mais recomendado (Mcveigh, et al, 2024).

O status de MMR desempenha um papel crucial em diversos processos clínicos, como, por exemplo, na avaliação da resposta à imunoterapia, o que levou a investigação de dMMR/MSI ser utilizada como um biomarcador terapêutico, não apenas em CCR, mas também em outros tumores. Além disso, a análise do status de MMR também é importante para identificar pacientes com CCR e com um prognóstico mais favorável. Dessa forma, a avaliação do status de MMR não só contribui para estratégias terapêuticas personalizadas, como também auxilia na previsão de desfechos clínicos mais precisos (Hewish, et al, 2010; Olave, Gaham, 2021). Por fim, o status de MMR/MSI é essencial para o rastreamento e diagnóstico potencial da SL, como veremos com maiores detalhes no tópico a seguir.

1.2 Síndrome de Predisposição hereditária ao câncer: Síndrome de Lynch (SL)

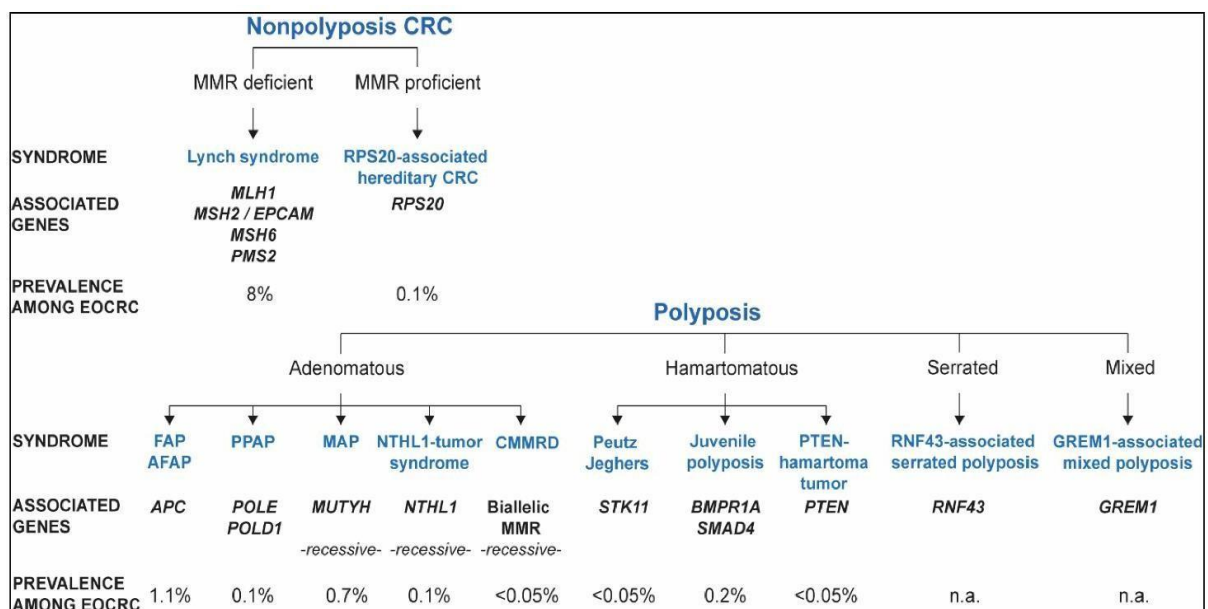
Cerca de 60 a 65% dos CCR surgem de modo esporádico, em indivíduos sem histórico familiar ou sem variantes genéticas hereditárias que aumentam o risco de CCR (Keum 2019). Já cerca de 20-30% casos aparentam ter algum componente de hereditariedade, visto que ocorrem em indivíduos com algum membro da família com CCR, mas são casos em que não se identifica alterações germinativas ligadas diretamente ao CCR (Keum, 2019). Por fim, cerca de 5-10% dos casos podem ser considerados hereditários, nos quais é identificada uma alteração germinativa em um gene de predisposição ao câncer.

De forma geral, o câncer colorretal hereditário pode ser classificado em duas grandes categorias: o câncer colorretal sem polipose (também denominado síndrome de Lynch) e o câncer colorretal com polipose (como na polipose adenomatosa familiar –

FAP, e outras síndromes) (Alvarez, et al, 2021). O câncer colorretal com polipose é caracterizado pela formação de múltiplos pólipos no cólon, os quais podem se transformar em tumores malignos ao longo do tempo, e está geralmente relacionado a alterações em genes como o *APC* (gene supressor de tumor) ou outros genes envolvidos na via de sinalização Wnt. Dentre as síndromes de polipose, as mais comuns são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), relacionada ao gene *APC* e de herança dominante, e a Polipose associada ao gene *MUTYH* (MAP), de herança recessiva (Keum, 2019; Cohen, et al, 2019). Já entre as síndromes não associadas a pólipos, a mais comum é a Síndrome de Lynch (SL), antigamente conhecida como câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC).

A figura 3 ilustra as principais condições genéticas e os genes diretamente relacionados ao câncer colorretal hereditário, demonstrando como essas síndromes hereditárias contribuem para a predisposição ao câncer colorretal. A compreensão desses mecanismos moleculares é fundamental para o diagnóstico precoce, aconselhamento genético e estratégias de rastreamento de indivíduos em risco, permitindo intervenções mais eficazes para prevenir o desenvolvimento do câncer.

Figura 3. Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal, desenvolvido por Alvarez MD, et al. 2021 <https://doi.org/10.3390/cells10030710>



Fonte: Alvarez MD, et al. 2021.

A Síndrome de Lynch (SL) é uma síndrome de predisposição genética ao câncer,

de transmissão autossômica dominante com penetrância incompleta (Cohen, et al, 2019). É a síndrome mais comum para o desenvolvimento da CCR hereditário, representando cerca de 2-3% de todos os CCR e 8% dos CCR em idade jovem (Hewish, et al, 2010). A SL é caracterizada por uma variante germinativa patogênica monoalélica em um dos genes do sistema de reparo do DNA, o sistema de *mismatch repair* (MMR), na qual envolve os genes *MLH1*, *MSH2* (ou deleções do gene *EPCAM*), *MSH6* e *PMS2* (Alvarez et al, 2021; Cohen, et al, 2019). A maioria dos pacientes com SL apresentam uma VGP dos genes *MLH1* ou *MSH2* (60% a 80% dos casos) (Alvarez, et al, 2021; Cohen, et al, 2019).

A SL é caracterizada pela predisposição a uma variedade de cânceres, envolvendo mais frequentemente o câncer colorretal e o câncer de endométrio (CE), além de outros órgãos, incluindo ovário, estômago, intestino delgado, trato hepatobiliar, pâncreas, trato urinário, próstata, cérebro e tumores sebáceos de pele.

A presença de uma VGP é necessária para estabelecer o diagnóstico definitivo. As estratégias de diagnóstico atuais incluem o estudo de famílias ou indivíduos com agregação familiar e/ou início precoce de tumores SL, o chamado teste universal de deficiência de MMR, que implica que todos os pacientes com CCR e CE sejam submetidos a IHQ tumoral nas proteínas MMR e/ou teste MSI (Alvarez, et al, 2021; Olave, Graham, 2021; Martínez-roca, et al, 2022).

O CCR associado a Lynch geralmente apresenta-se em uma idade mais precoce do diagnóstico, levando à recomendação de iniciar a triagem com colonoscopia em famílias com SL entre as idades de 20-25 anos (Umar, et al, 2004; Alvarez, et al, 2021). Além disso, os tumores associados a Lynch ocorrem com mais frequência no cólon proximal/lado direito do que no CCR esporádico. Histologicamente, a diferenciação com características mucinosas, reação linfoide tipo *Crohn* e linfócitos infiltrados no tumor são todos sugestivos de CCR associado a Lynch e são referidos como características histológicas relacionadas à MSI-H (Umar, et al, 2004; Alvarez, et al, 2021).

A triagem “padrão-ouro” para detecção da SL é feita pela testagem dos tumores para MSI e/ou perda de expressão por IHQ das proteínas MMR. A realização desses testes em todos os casos de CCR e de endométrio é conhecida como “triagem universal” e já é adotada em diversos centros mundialmente. Não há consenso sobre o melhor teste a ser aplicado, entre IHQ MMR ou o teste MSI em câncer colorretal, pois eles apresentam características de desempenho semelhantes na detecção de SL, sendo a sensibilidade do MSI de 88 ~ 100% e da IHQ de 73 ~ 100%, com especificidade do MSI 68 ~ 84% *versus*

IHQ 78 ~ 98% (Cerretelli, et al, 2020).

Caso o resultado da IHQ revele a perda de expressão do dímero MLH1/PMS2, a recomendação é que o tumor seja testado para metilação do promotor de *MLH1* e/ou mutação *BRAF* V600E para descartar tumores esporádicos relacionados à via CIMP (Cerretelli, et al, 2020; McVeigh, et al, 2024). Se esses testes forem negativos, os pacientes devem ser submetidos ao teste de linhagem germinativa, que inclui avaliação de alterações pontuais e a análise de deleções e duplicações nos genes MMR e grandes deleções no gene *EPCAM*. Por outro lado, outros padrões de perda de MMR como a perda de MSH2/MSH6, ou perdas isoladas de MSH6 ou PMS2 já são indicativos da realização da testagem germinativa. Os resultados dos testes germinativos poderão confirmar um diagnóstico de SL (Cerretelli, et al, 2020; McVeigh, et al, 2024).

Muitos casos de pacientes com CCR ou EC e dMMR são submetidos à investigação médica com suspeita de SL e, no entanto, não aparentam nenhuma alteração germinativa detectada nos genes de MMR, nem alteração no gene *BRAF* ou hipermetilação de *MLH1*. Esses casos são definidos como Síndrome de Lynch-Like (SLL), ou, como mais recomendado atualmente: deficiência inexplicada do sistema *Mismatch repair* (do inglês: *unexplained mismatch repair deficiency* (u-dMMR) (Cerretelli, et al, 2020; McVeigh, et al, 2024).

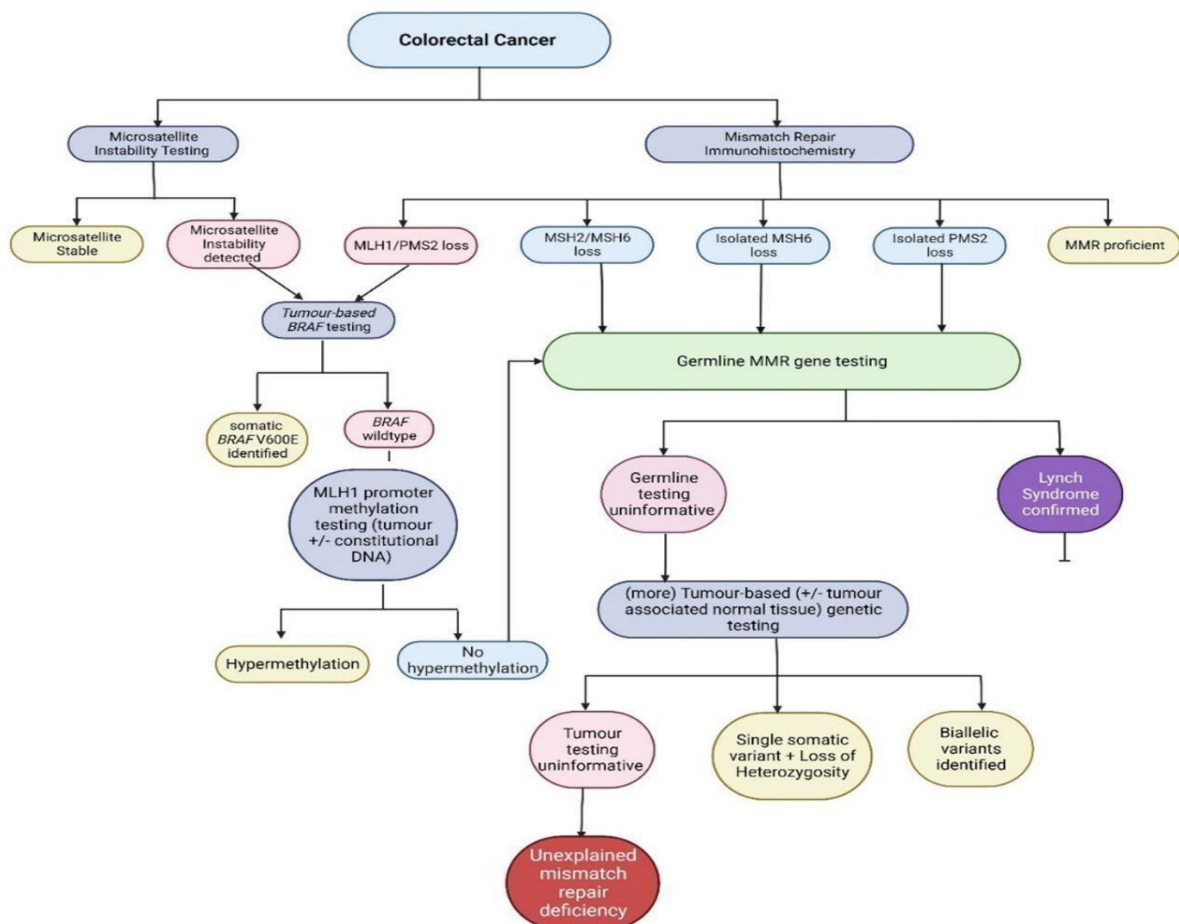
1.3 Deficiência inexplicada de MMR (u-dMMR)

A deficiência inexplicada em MMR (u-dMMR) refere-se a casos em que tumores dos espectro de Lynch (especialmente CCR, EC e câncer gástrico) apresentam MSI e/ou perda de expressão de MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2, nos quais não foram detectadas alterações germinativas em MMR ou alterações somáticas em *BRAF* (somente para CCR) ou de hipermetilação do promotor de *MLH1* (McVeigh, et al, 2024). A u-dMMR corresponde a 30% dos pacientes com tumores MSI e está associada a um grupo heterogêneo de pacientes, que podem ter causas esporádicas e hereditárias.

Na literatura, muitos esforços são destinados para encontrar as causas que acarretam a deficiência de MMR nesses casos específicos. Dentre as explicações identificadas para as causas potenciais de desenvolver u-dMMR, no aspecto hereditário, podem estar atreladas a alterações germinativas de MMR não identificadas nos testes genéticos comuns (como alterações intrônicas profundas ou inversões gênicas), ou ainda,

alterações germinativas em outros genes que mimetizam defeitos em MMR. No entanto, na maior parte dos casos (cerca de 50%), são identificadas causas somáticas, como por exemplo, relacionadas a mutações somáticas bialélicas dos genes MMR (Roca, et al, 2022). E por fim, mesmo após extensa investigação, cerca de 1/3 dos casos de u-dMMR permanecem sem uma causa identificável.

Figura 4 – Caminho para investigação de deficiência de reparo de incompatibilidade (MMR) e/ou instabilidade de microssatélites em cânceres colorretais. As decisões sobre a extensão da investigação ao longo deste caminho são orientadas pela suspeita clínica e pela disponibilidade de investigações relevantes. Se a investigação for interrompida após o teste do gene MMR na linhagem germinativa, a proporção de deficiência inexplicada de MMR será maior.



Fonte: McVeigh TP, et al, 2024.

Na figura 4 é possível analisar o caminho da investigação para determinar a origem da deficiência de MMR em CCR. Os dois testes padrões realizados na triagem

universal são determinados por *guidelines* específicos, sendo eles a investigação de MSI por meio da PCR ou de expressão das proteínas MMR, por meio do teste de IHQ (Roca, et al, 2022; McVeight, et al, 2024).

Dependendo do padrão de perda de expressão proteica encontrado nos casos dMMR, a investigação seguirá caminhos distintos. Para pacientes com perda de MLH1/PMS2 ou MSI-H, a análise somática por teste do gene *BRAF* (V600E) e avaliação de metilação do promotor de *MLH1* é realizada para excluir/confirmar a via mais comum de dMMR (via esporádica por hipermetilação de *MLH1*). O teste genético de linhagem germinativa será indicado para os casos negativos nas investigações de *BRAF*/Metilação *MLH1* e para os casos com perdas em MSH2, MSH6 e PMS2 isolado (McVeigh, et al, 2024).

A perda isolada de MSH2 ou a perda de MSH2/MSH6 sugere que uma mutação ou alteração em *MSH2* é mais provável. Da mesma forma, a perda apenas de MLH1 ou a perda de MLH1 e PMS2 sugere uma mutação, alteração ou metilação do promotor em *MLH1*. A perda combinada de MSH2 e MSH6 (ou de MLH1 e PMS2) reflete a ligação heterodimérica de MSH2 com MSH6 (ou de MLH1 com PMS2) no complexo de reparo de incompatibilidade MutS α (ou de MutL α), de modo que a perda da primeira gera uma ausência de estabilidade e degradação da segunda proteína (McVeigh, et al, 2024).

A implementação da triagem universal para SL, como a análise de MSI ou de expressão de MMR por IHC, em conjunto com o aumento da testagem de MSI como fator preditivo para imunoterapia, levou a um aumento na detecção de tumores que exibem MSI ou dMMR. No entanto, de acordo com a literatura recente, após a triagem muitos casos permanecem sem uma investigação completa da causa da deficiência de MMR (Umar, et al, 2004; Pellat, et al, 2019). A ausência de definição dessa causa está associada à incerteza quanto ao manejo preventivo dos pacientes e seus familiares, pois não há consenso sobre se deve ser considerado uma provável condição hereditária ou esporádica.

Os estudos recentes não encontraram ainda uma clara diferenciação clínica entre os casos esporádicos e hereditários em pacientes com u-dMMR. Nesses casos, análises somáticas e germinativas mais aprofundadas são necessários para aferir as causas da formação do tumor.

A identificação das causas de dMMR apresenta implicações clínicas para o manejo do paciente e seus familiares. A utilização de múltiplos testes moleculares, como metilação no promotor de *MLH1*, mutação de *BRAF* e sequenciamento somático de MMR são essenciais para a determinação das causas de MMR e identificação de tumores

esporádicos. Essa identificação é importante, pois, auxilia no manejo dos pacientes, diminuindo as etapas de investigação clínica e possibilitando o correto aconselhamento genético. Assim, esperamos com esse estudo contribuir com a caracterização das causas somáticas e germinativas raras para perda de MMR, para auxiliar no seguimento mais adequado para esses pacientes e promover a utilização desses testes moleculares na prática clínica.

2. OBJETIVO

2.1 Objetivo Geral

Investigar mecanismos somáticos e germinativos raros que levam à deficiência inexplicada de MMR em pacientes com câncer colorretal (CCR), câncer de endométrio (CE) e câncer gástrico (CG).

2.2 Objetivos Específicos

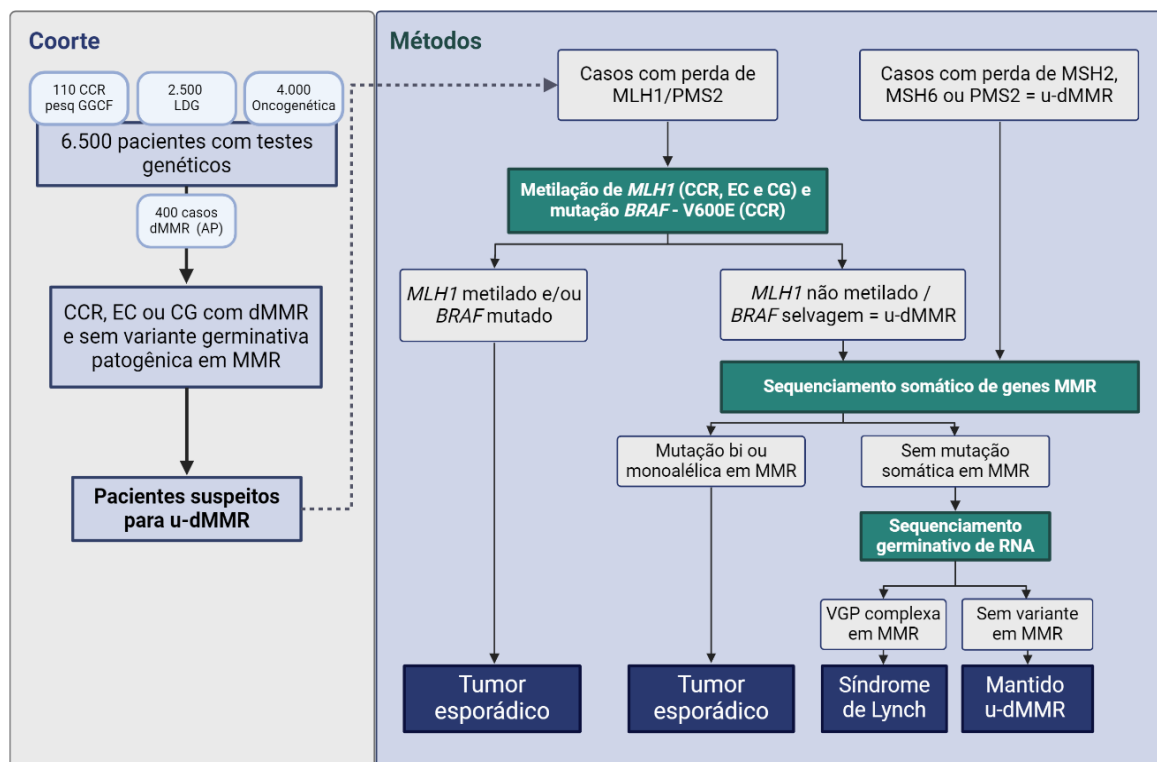
- Identificar casos de pacientes com perda inexplicada de MMR com tumores CCR, CE e CG, através da revisão de bancos de dados de pesquisa e da clínica;
- Realizar a avaliação de metilação de *MLH1* (todos os tumores) e análise de mutação de *BRAF* (CCR) nos casos com perda de expressão de MLH1 e PMS2;
- Avaliar a frequência de causas esporádicas de u-dMMR através do sequenciamento somático dos genes MMR;
- Investigar a frequência de alterações germinativas complexas que levem à u-dMMR através de sequenciamento de RNA constitutivo.

3. METODOLOGIA

3.1 Casuística

Para identificação dos pacientes de interesse, realizamos o levantamento de dados de projetos anteriores do grupo (110 pacientes com câncer colorretal), de testes genéticos do Laboratório de Diagnóstico Genômico do A.C.Camargo Cancer Center (LDG) (aproximadamente 2.500 pacientes), do banco de dados clínico do Departamento de Oncogenética desta instituição (mais de 4.000 pacientes) e bancos de casos de tumores dMMR do departamento de Anatomia Patológica (cerca de 400 casos).

Foram incluídos pacientes acima de 18 anos, que realizaram teste genético por suspeita de SL, diagnosticados com câncer colorretal, de endométrio ou gástrico com deficiência de MMR para os quais o teste genético não identificou alteração germinativa patogênica. Em contrapartida, excluímos os pacientes que não aceitaram participar do estudo após aplicação do termo de consentimento livre e esclarecido. O estudo foi aprovado pelo comitê de ética (3415/23).

Figura 5 – Desenho do estudo e panorama das análises realizadas.

Fonte: autoria própria.

Legenda: GGCF: Grupo de Genômica Clínica e Funcional; LDG: Laboratório de Diagnóstico Genômico; AP: Departamento de Anatomia Patológica, CCR: Câncer Colorretal; EC: Câncer de endométrio; CG: câncer gástrico; dMMR: Deficiência de *Mismatch repair*; MMR: Mismatch repair; u-dMMR: deficiência de *Mismatch repair* inexplicada; VGP: variante germinativa patogênica.

3.2 Extração de DNA e RNA

Foram selecionados casos com material tumoral fresco congelado ou fixado em formalina (FFPE) depositados no Biobanco ou no Arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.CC. O material do tumor foi avaliado por um patologista para avaliação da porcentagem de células tumorais, sendo selecionadas áreas contendo pelo menos 40% de células de tumor. Para um caso, foi realizada coleta prospectiva de sangue periférico para extração de RNA. O DNA e o RNA dos tumores e de leucócito foram extraídos e processados no Biobanco, seguindo seus procedimentos padrão. A integridade e concentração do DNA e RNA foram avaliadas pelos kits adequados nos equipamentos TapeStation (Agilent) e Qubit® (Life Technologies).

3.3 Análise de metilação do promotor de *MLH1*

Para identificar os pacientes com perda de expressão em *MLH1* e *PMS2* de causas somáticas, primeiramente realizamos a análise da metilação do promotor do *MLH1*. Nesse método utilizamos NGS (*Next-Generation Sequencing*) baseado em *amplicon*. O protocolo de metilação de *MLH1* e análise de mutação somática em *BRAF*, foi desenvolvido em uma tese do grupo e foi seguido para a realização dos procedimentos laboratoriais (Silva, et al, 2023).

A análise do promotor de *MLH1* baseia-se na conversão de DNA do tumor usando bissulfito de sódio. O bissulfito de sódio converte citosinas não metiladas (C) em uracilas (U), que são substituídas por timinas durante os ciclos de PCR. O C metilado permanece inalterado após o tratamento.

Para a reação de conversão do bissulfito, 20ul de DNA (50 ng), foram tratados com o kit *EZ DNA Methylation- Lightning*, seguindo o protocolo do fabricante. O DNA convertido foi submetido a uma reação de PCR contendo: 0,15 uL de Taq High-fidelity (Invitrogen), 1,2 uL de MgSO₄ 50 mM, 0,6uL de dNTP 10 mM, 5 mM de cada primer em uma reação de 5 uL. As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min de pré-incubação a 94 °C em 1 ciclo, seguido de 40 ciclos de 30s a 94 °C, 30s à temperatura de anelamento (protocolo de *touchdown* começando em 50 °C e reduzindo 0,2 °C em cada ciclo), e um minuto a 68°C, com uma extensão final de 10 minutos a 68°C.

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose a 2%. Após confirmação da amplificação seguiu para a construção da biblioteca de *amplicon*. Os produtos de PCR foram utilizados para gerar bibliotecas de amplicons com o kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher) e sequenciados na plataforma Ion S5.

Para a análise usou-se o software CLC *Genomic Workbench* no qual as leituras do sequenciamento foram mapeadas na sequência referência e avaliada a razão de metilação em dinucleotídeos CpG. As leituras geradas foram mapeadas para uma referência da região do promotor do *MLH1* convertida (C modificado para T) *in silico*.

As frequências das bases C e T de cinco citosinas CpGs e três citosinas controle (não no contexto de CpGs) foram anotadas e a média foi considerada entre os quatro CpGs com menor desvio. A conversão do bissulfito foi considerada eficiente quando a frequência média de bases C nas três citosinas controle foi <2%. As amostras foram consideradas positivas quando a frequência média de bases C nos 4 locais de citosinas CpG foi > 10%.

3.4 Análise de mutação no gene *BRAF* (V600E)

Na análise de mutação no gene *BRAF*, códon p.Val600Glu (V600E), o DNA foi submetido a reações de PCR contendo 12,5 uL de GoTaq® DNA Polimerase (Promega), 5 mM de cada primer e 2 uL de DNA (10 a 100 ng) em uma reação de 25 uL. As condições de amplificação foram as seguintes: 2 min a 95 °C seguidos de 35 ciclos de 30 s a 95 °C, 1 min a 60 °C e 45 s a 72 °C, com uma extensão final de 5 min a 72 °C.

Os produtos de PCR foram utilizados para gerar bibliotecas de amplicons e sequenciados conforme descrito para *MLH1*. As leituras de sequenciamento foram analisadas com as ferramentas do Torrent Suit e Variant Caller. Os critérios para chamada de variantes foram cobertura mínima de 500 leituras e frequência alélica da variante de pelo menos 2%.

3.5 Sequenciamento somático dos genes MMR

O DNA tumoral de pacientes classificados como u-dMMR foi analisado quanto à presença de mutações somáticas nos genes de reparo de DNA (MMR) por meio do sequenciamento de painéis multigênicos via NGS (*Comprehensive Genomic Profiling* – CGP). A análise de CGP foi realizada utilizando um dos três painéis amplos previamente validados em nosso laboratório — CCP, OCAPlus ou TSO (descritos abaixo) — para a detecção de mutações somáticas em DNA de amostras de tumor fresco e/ou FFPE, conforme a disponibilidade.

O painel comercial *Comprehensive Cancer Panel* (CCP) (Thermo Fisher, EUA), de 1.300kb, abrange 409 oncogenes e genes supressores de tumor relacionados ao câncer, dentre eles os 4 genes MMR relevantes para esse estudo. A abordagem se baseia na amplificação da região codificadora dos genes alvo seguida de sequenciamento na plataforma de análise Ion S5. Já o painel *Oncomine Comprehensive Assay Plus* (OCAPlus) abrange 517 genes para a detecção de mutações somáticas e de outros biomarcadores complexos associados a imunoterapias, como carga mutacional (TMB – do inglês *Tumor Mutation Burden*) e MSI. O painel também é baseado em amplificação das regiões alvo. Após a preparação da biblioteca as amostras são multiplexadas e sequenciadas nos sistemas Ion S5.

A análise de cobertura e a chamada de variantes dos painéis CCP e OCAPlus

foram realizadas no TorrentSuite software. Foram consideradas amostras com resultados satisfatórios aquelas que alcançaram pelo menos 90% das bases com cobertura >100X. Os arquivos VCFs foram importados para o software VarSeq (Golden Helix) para anotações adicionais e filtragem de variantes. Os genes MMR foram avaliados para a presença de mutações pontuais (SNVs [*single nucleotide variants*] e *indels*) de perda de função ou reconhecidamente patogênicas. Os eventos de inativação do alelo selvagem por deleções amplas foram investigados pela comparação da frequência alélica das variantes (VAFs) identificadas em cada amostra, para inferir a ocorrência de perda de heterozigose (LOH). Além disso, para o painel OCAPlus, também foi realizada a chamada de variantes e análise pelo software IonReporter, para verificar o índice de TMB e presença de MSI. Os painéis CCP e OCAPlus não estão validados para a detecção de variantes de número de cópias (CNVs) .

O painel *TruSight Oncology Cancer Panel* (TSO) é um painel de sequenciamento direcionado projetado para a detecção de mutações somáticas em 523 genes, além da análise de SNVs, variantes de número de cópias (CNV), indels, fusões gênicas, assim como MSI e TMB. A metodologia de sequenciamento baseia-se na captura híbrida de alvos específicos com DNA direcionado, garantindo alta sensibilidade na detecção de variantes. Após a construção das bibliotecas, o sequenciamento é realizado na plataforma Illumina NextSeq500. Após o sequenciamento, as sequências são alinhadas utilizando os *pipelines* da Illumina Connected Analytics para análise primária e secundária dos dados. São obtidos os scores de TMB e instabilidade de microssatélites (MSI). Para a análise terciária das alterações no DNA (SNV, indel, CNV), utiliza-se os *pipelines* da Sophia DDM (SOPHiA GENETICS). Foram consideradas amostras com resultados satisfatórios aquelas que alcançaram pelo menos 90% das bases com cobertura >100X. O teste já foi padronizado no Grupo de pesquisa - Genômica Clínica e Funcional/CIPE – e os resultados demonstraram a alta qualidade e reprodutibilidade do ensaio.

3.6 Sequenciamento germinativo de RNA

Para os pacientes nos quais não foram detectadas mutações somáticas em MMR, foi realizado o sequenciamento germinativo de RNA com o intuito de detectar alterações germinativas raras que afetassem os genes MMR. Para a captura de RNA, foi utilizado um painel customizado contendo sondas para a captura das regiões *exônicas* e *intrônicas*

flanqueadoras de 27 genes de predisposição ao câncer, incluindo os 4 genes de reparo MMR. As bibliotecas de DNA complementar (cDNA) foram geradas utilizando o kit xGen™ RNA Library Prep Kit (IDT Technologies). As bibliotecas amplificadas foram agrupadas em pools de 12 amostras, submetidas à captura com sondas de DNA com o kit xGen Hybridization and Wash (IDT Technologies), e sequenciadas no equipamento NextSeq 2000 (Illumina) (2 X 150 pares de base).

As análises de bioinformática foram realizadas em colaboração com a *facility* de Bioinformática do A.C.Camargo Cancer Center e com a doutora do grupo Larissa Dias de Souza, que validou a análise desse painel em seu projeto de doutorado intitulado “*Abordagens genômicas para reclassificar variantes de significado incerto não codificantes e de efeito de splice em genes de predisposição hereditária ao câncer*” de 2025.

Resumidamente, os dados gerados foram alinhados ao genoma de referência humano usando o alinhador STAR v2.6.0c. Foi realizada análise de controle de qualidade para avaliar a eficiência de captura e a taxa de cobertura dos 4 genes de interesse. As amostras foram consideradas adequadas quando $\geq 85\%$ das regiões de interesse apresentaram cobertura média $\geq 50X$. As leituras mapeadas foram analisadas por *pipeline* desenvolvido *in house*, baseado no descrito por Schafer e colaboradores (<https://github.com/MIAOKUI/PSI>), para detectar eventos de *splicing*. Para cada gene, foi determinada uma isoforma padrão, e foi calculado o valor de *Percent Spliced In* (PSI) de cada éxon. O PSI foi definido como o número de leituras que suportaram o evento de *splicing* alternativo (ou seja, o evento não canônico ou anormal) dividido pelo número total de leituras da região do evento de *splicing*. Para identificar as variantes de *splicing*, foi avaliada a diferença de PSI entre o paciente e os dados de um grupo de controles já disponível, utilizando um teste *t* bilateral de uma amostra. Um evento de *splicing* de um paciente foi considerado significativo quando quando a diferença do seu PSI em relação à média do PSI dos doadores saudáveis foi $\geq 20\%$, com valor de $p \leq 0,05$ e FDR $\leq 0,05$, e o PSI do evento no paciente caso for $>20\%$ (para eventos RI e A3SS/A5SS) ou $<80\%$ para eventos de SE.

4. RESULTADOS

4.1 Caracterização dos casos com deficiência em MMR

A seleção dos pacientes de interesse (casos com tumores dMMR com teste genético germinativo negativo), foi realizada a partir do levantamento e cruzamento de dados de projetos anteriores do grupo e outros bancos de dados da instituição ACCCC, incluindo os resultados do programa de triagem universal realizado no Departamento de Anatomia Patológica e dados de testes genéticos germinativos do Laboratório de Diagnóstico Genômico (LDG) e Departamento de Oncogenética.

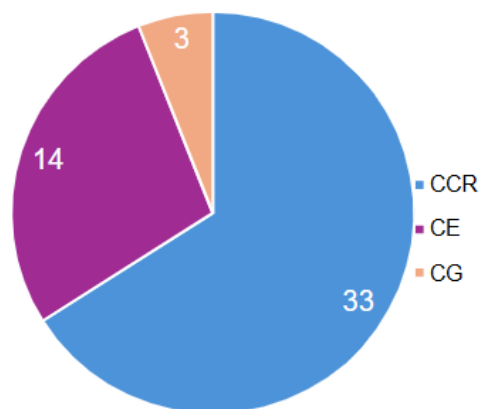
Para o desenvolvimento do estudo, identificamos 50 pacientes elegíveis com os tumores de interesse, os quais contabilizaram 33 CCR, 14 CE e 3 CG (Figura 6A). Na nossa coorte os casos femininos tiveram maior presença contabilizando 70% dos casos (35/50), com média de idade no diagnóstico de 58,7 anos, variando entre 34 e 83 anos. Os tipos de tumores mais frequentes nesse grupo foram CCR (55,5%), seguido por CE (41,7%) e CG (2,8%) (Figura 6B).

Nos pacientes do sexo masculino, totalizando 30% (15/50), a idade variou entre 25 e 92 anos, com média de 56,6 anos. Nesses casos, o câncer colorretal apresentou maior porcentagem (86,6%), seguido pelo câncer gástrico (13,4%) (Figura 6B). A média de idade de cada tipo de tumor, independente do sexo, está representada na Figura 6C.

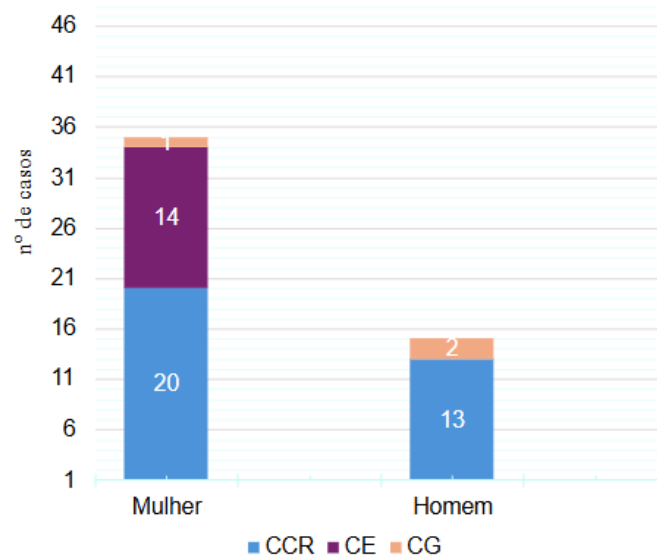
A avaliação do histórico familiar de câncer entre os pacientes revelou que a maioria 70,5% (38) (pacientes com informação em prontuário) apresentou um histórico familiar positivo para câncer, considerando parentes de primeiro e segundo grau. Entre os tipos de câncer relatados nos familiares, destacaram-se os tumores de mama (11 pacientes), rim (8 pacientes), pulmão (5 pacientes), colorretal (5 pacientes), endometrial (2 pacientes), intestino (1 paciente), fígado (1 pacientes), entre outros (Figura 6D).

Figura 6 - Distribuição dos tumores selecionados para investigação de deficiência no sistema de reparo de DNA (dMMR). A. Tipos de tumores analisados: CCR (n=33), CE (n=14) e CG (n=3). B. Relação entre o tipo de tumor e o sexo dos pacientes: maior frequência de CCR em ambos os sexos, sendo o CE observado apenas em mulheres e o CG apenas em homens. C. Média de idade dos pacientes segundo o tipo de tumor: CCR (53,7 anos), CE (62,0 anos) e CG (67,0 anos). D. Histórico familiar de neoplasias nos pacientes avaliados, com maior número de câncer de mama (n=11), seguido por câncer rim (n=8) e pulmão (n=5).

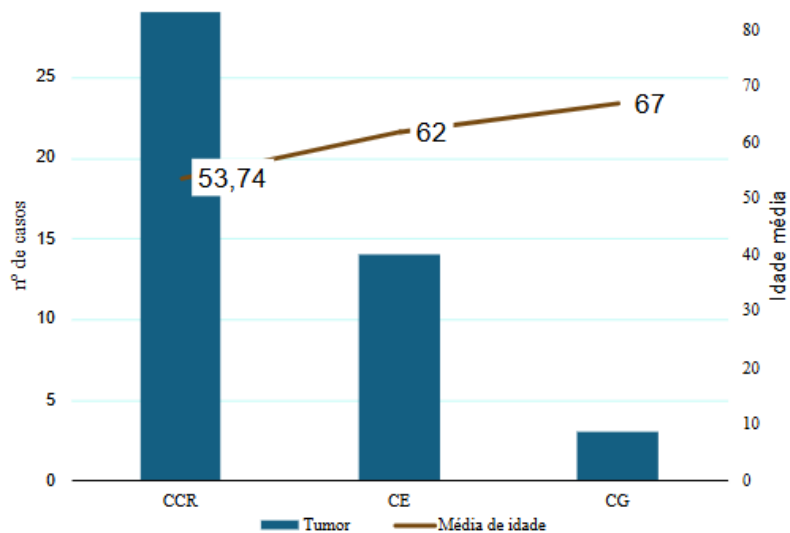
A. Tipos de tumores selecionados para investigação de dMMR



B. Relação entre tumor e sexo dos pacientes



C. Relação entre o tipo de tumor e a média de idade entre os pacientes selecionados



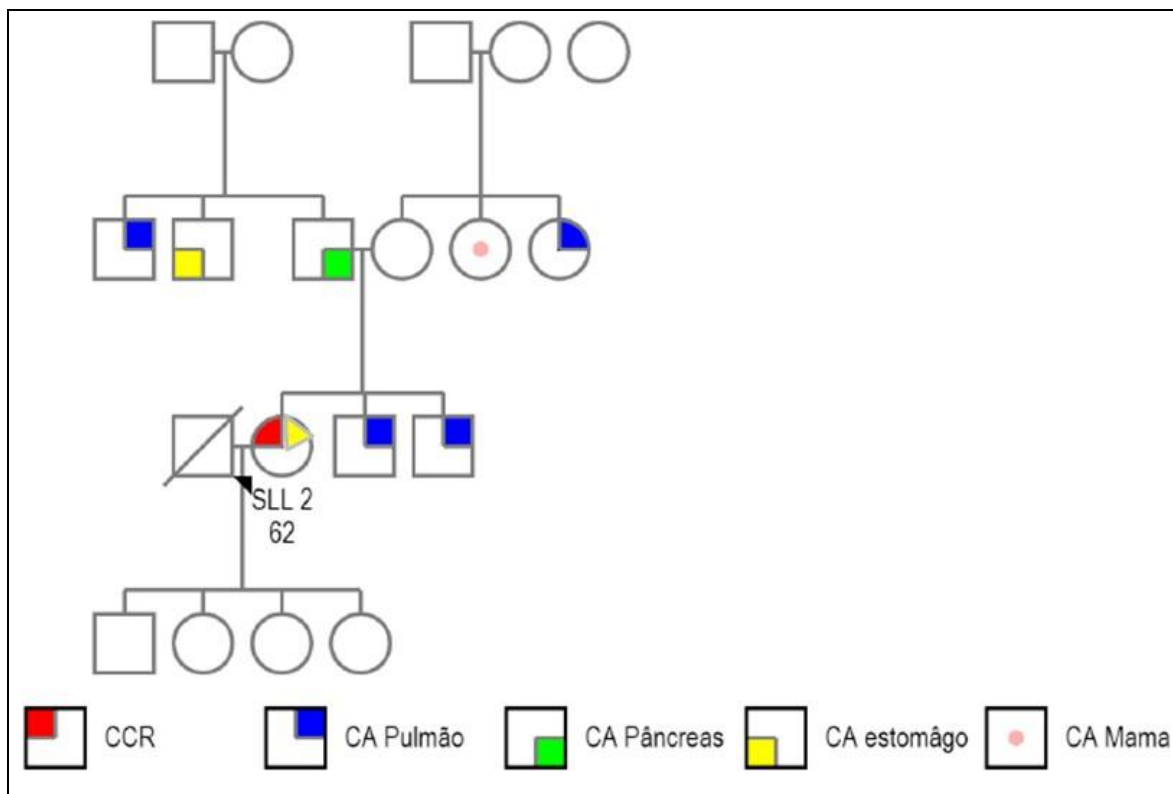
D. Histórico familiar



Fonte: Autoria própria.

A Figura 7 representa o heredograma de uma das pacientes do estudo, acometida por 2 tumores primários (CCR aos 62 anos e câncer de estômago aos 68 anos) e apresentando múltiplos familiares com câncer.

Figura 7 – Heredograma do Caso SLL 2. Paciente diagnosticada com câncer colorretal e câncer de estômago (tumor gástrico neuroendócrino), apresentando um histórico familiar com múltiplas patologias ao longo das gerações. Dentre os cânceres registrados em familiares, destacam-se câncer de pulmão, pâncreas, estômago e mama.



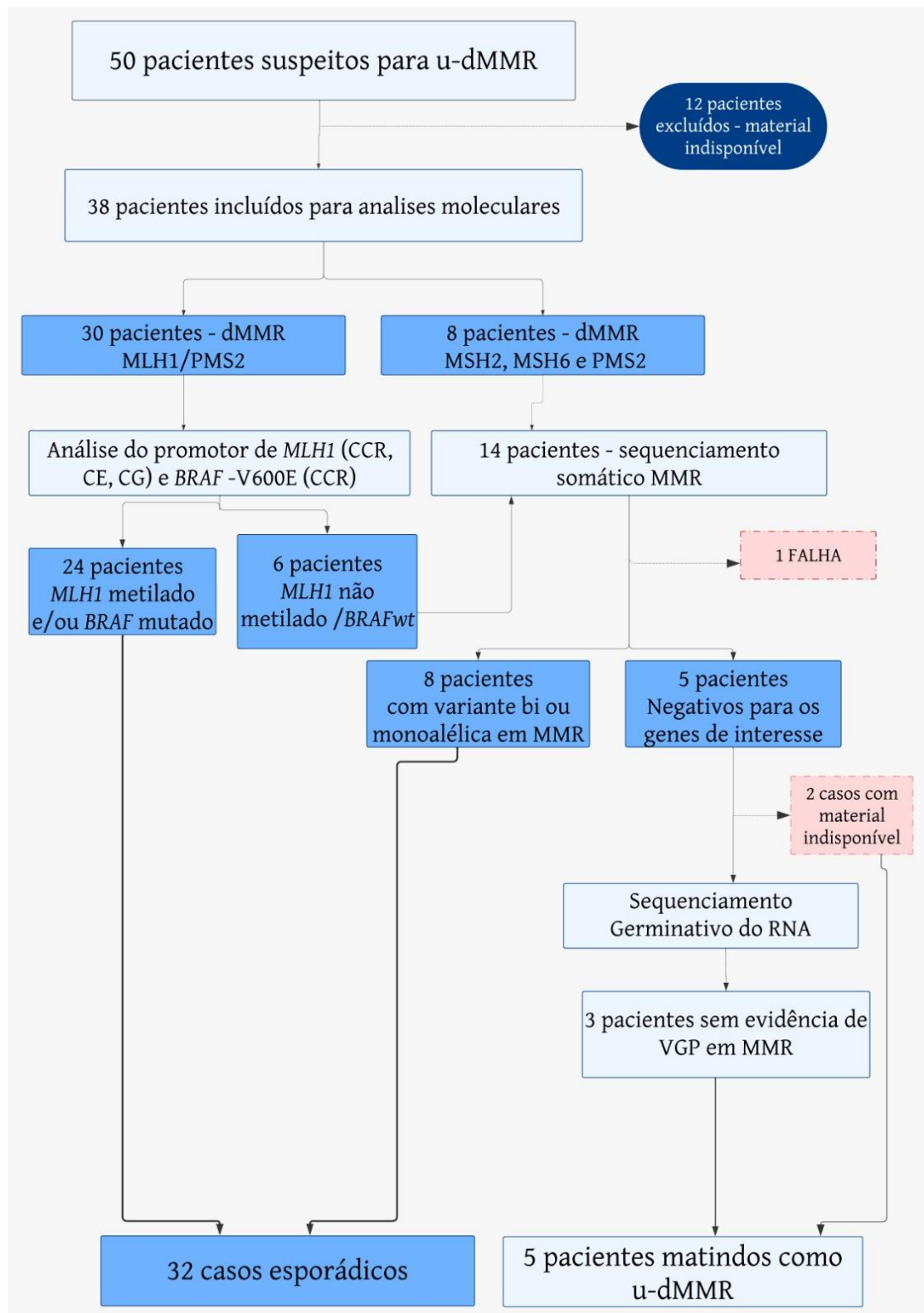
Fonte: autoria própria

Legenda: CCR - Câncer colorretal; CA - câncer.

Em nossa coorte total, 76% (38/50) dos pacientes apresentam perda de expressão das proteínas MLH1/PMS2, e 14% (7/50) tiveram perda de expressão de MSH2/MSH6. A perda isolada das proteínas MSH6 (4% - 2/50) e PMS2 (4% - 2/50) ocorreu em menor frequência, e apenas um caso (2%) apresentou perda de expressão nas enzimas MLH1/PMS2 e MSH6 (1/50).

O resultado desse levantamento contabilizou 50 pacientes elegíveis identificados, no entanto, foi possível obter material de tumor para 38 casos, que foram submetidos as análises moleculares descritas a seguir e representadas na figura 8. Os resultados dessas análises estão descritos nas próximas seções.

Figura 8 – Fluxograma. Processo escalonado de seleção de pacientes no ACCC com perda inexplicada da expressão das enzimas MMR, com aplicação sequencial dos procedimentos conforme os resultados das etapas.



Fonte: autoria própria.

4.2 Avaliação de metilação do promotor de *MLH1* e mutação *BRAF* V600E para identificação de casos esporádicos

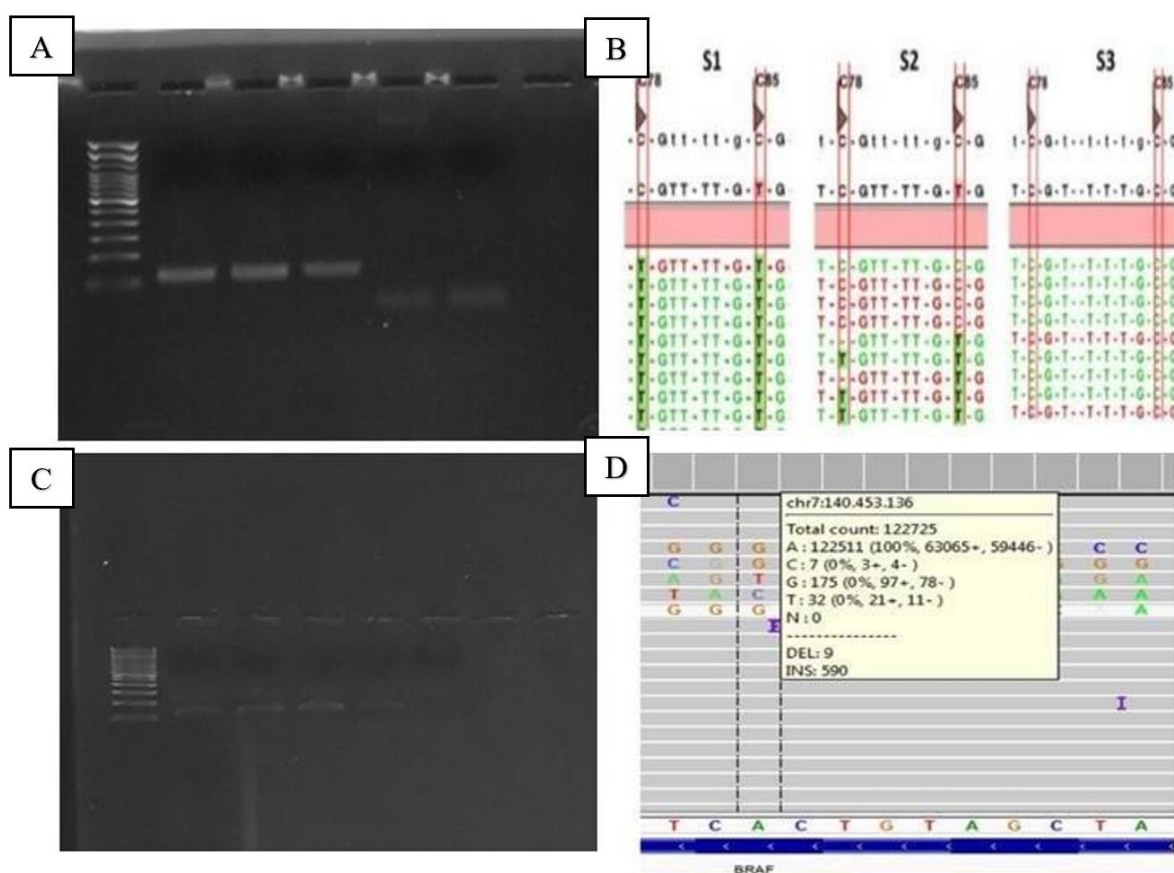
O fluxo mais recomendado após a realização do rastreamento universal é que seja realizada a análise da metilação do promotor do *MLH1* (todos os tumores) e do gene *BRAF* (somente em colorretal) para os casos com perda de expressão de MLH1/PMS2. Assim, caso verifique a presença da mutação ou da metilação, o caso é classificado como esporádico. No entanto, vários casos rastreados em nosso estudo não apresentavam esses resultados em testes de rotina, e por isso essa avaliação foi realizada dentro do estudo.

Nessa etapa foram testados 30/38 pacientes que apresentaram perda de expressão de MLH1/PMS2, seguindo os protocolos descritos no item 3.3 Metodologia. A análise de metilação do promotor de *MLH1* detectou a hipermetilação em 24/30 (80%) casos, sendo 14/20 dos casos de CCR, 9/9 dos casos de CE e o único caso de CG avaliado foi positivo para metilação (Tabela 2). As figuras 9-A e 9-B apresentam exemplos de resultados dessa análise.

A análise de mutação do gene *BRAF* foi realizada em 20 casos com CCR, desses 40% (8/20) apresentaram mutação *BRAF* V600E, e 60% (12/20) não apresentaram a mutação no gene *BRAF* V600E. As figuras 9-C e 9-D apresentam exemplos dessa análise. Por fim, 6 casos (todos de CCR) foram negativos para a avaliação dos dois biomarcadores, sendo mantidos como casos de u-dMMR (Tabela 2).

Figura 9 – Visualização do resultado de avaliação do sequenciamento do promotor de *MLH1* e mutação de *BRAF*. A. A confirmação da amplificação da PCR para a região do promotor de *MLH1* em gel de agarose (2%), após a conversão de bissulfito do DNA tumoral; B. Análise do perfil de metilação das amostras, realizada no software CLC, observando as regiões CpG. Quando a frequência média de metilação é superior a 10% as amostras são classificadas como positivas para metilação (exemplo S2 e S3); C. Confirmação de amplificação da PCR do gene *BRAF* (V600E) por gel de agarose (2%); D. Análise de mutação *BRAF*, mostrando em destaque a posição cromossômica Chr7:140453136. O gene *BRAF* é considerado mutado nessa posição quando a troca de A>T é maior que 2%.

Figura 9 – Visualização do resultado de avaliação do sequenciamento do promotor de *MLH1* e mutação de *BRAF*. A. A confirmação da amplificação da PCR para a região do promotor de *MLH1* em gel de agarose (2%), após a conversão de bissulfito do DNA tumoral; B. Análise do perfil de metilação das amostras, realizada no software CLC, observando as regiões CpG. Quando a frequência média de metilação é superior a 10% as amostras são classificadas como positivas para metilação (exemplo S2 e S3); C. Confirmação de amplificação da PCR do gene *BRAF* (V600E) por gel de agarose (2%); D. Análise de mutação *BRAF*, mostrando em destaque a posição cromossômica Chr7:140453136. O gene *BRAF* é considerado mutado nessa posição quando a troca de A>T é maior que 2%.



Fonte: Autoria própria.

Tabela 2 – Análise da metilação do promotor de *MLH1* em tumores CCR, CE e CG, com avaliação concomitante da mutação *BRAF* (V600E) nos casos de CCR, em tumores com perda de expressão de *MLH1*/*PMS2* por IHQ.

ID	Tumor	Sexo	Idade do diagnóstico	% de metilação	<i>BRAF</i>	Classificação
SLL 1	CE	F	83	77%	na	Esporádico
SLL 3	CE	F	63	85%	na	Esporádico
SLL 5	CCR	F	55	87%	Não mutado	Esporádico
SLL 7	CCR	F	62	41%	Não mutado	Esporádico
SLL 8	CCR	M	48	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 9	CCR	F	34	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 12	CCR	M	25	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 13	CCR	F	56	66%	Não mutado	Esporádico
SLL 14	CCR	M	60	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 15	CCR	M	47	29%	Não mutado	Esporádico
SLL 16	CE	F	63	55%	na	Esporádico
SLL 18	CE	F	60	14%	na	Esporádico
SLL 20	CG	M	80	60%	na	Esporádico
SLL 23	CCR	M	44	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 24	CCR	M	57	90%	Mutado	Esporádico
SLL 25	CCR	F	63	Não metilado	Não mutado	u-dMMR
SLL 28	CE	M	43	78%	na	Esporádico
SLL 29	CE	F	62	84%	na	Esporádico
SLL 30	CE	F	62	43%	na	Esporádico
SLL 31	CE	F	74	65%	na	Esporádico
SLL 39	CCR	F	61	32%	Mutado	Esporádico
SLL 41	CCR	M	34	24%	Não mutado	Esporádico
SLL 42	CCR	F	66	61%	Não mutado	Esporádico
SLL 43	CCR	F	76	79%	Mutado	Esporádico
SLL 45	CCR	M	74	90%	Mutado	Esporádico
SLL 48	CE	F	48	30%	na	Esporádico
SLL 49	CCR	M	59	70%	Mutado	Esporádico
SLL 51	CCR	F	54	55%	Mutado	Esporádico
SLL 52	CCR	F	66	56%	Mutado	Esporádico
SLL 53	CCR	F	69	51%	Mutado	Esporádico
TOTAL: 30 casos						

Fonte: autoria própria.

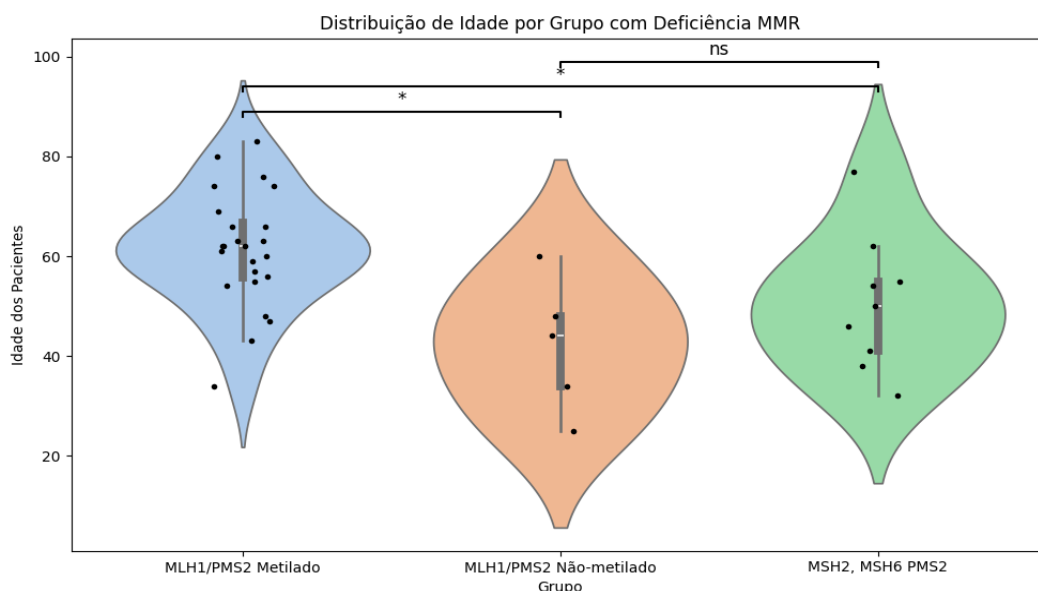
Legenda: ID - Identificação da amostra; IHQ - Imunohistoquímica; CE - Câncer de Endométrio; CCR - Câncer colorretal; CG - Câncer gástrico; F – Feminino; M – Masculino; na – não se aplica.

A mutação *BRAF* (V600E) está presente ~10% dos CCR, e está fortemente associada à metilação de *MLH1*. Na nossa coorte, identificamos 6/14 casos de CCR nos quais as amostras tumorais apresentaram hipermetilação no promotor do gene *MLH1*

(SLL 5, SLL 7, SLL 13, SLL 15, SLL 41, SLL 42), mas foram negativas para mutações no gene *BRAF* (V600E). Para investigar se essa hipermetilação poderia ser de origem germinativa, realizamos a análise de hipermetilação do promotor de *MLH1* também nas amostras de leucócitos dos mesmos pacientes. O resultado dessa análise mostrou ausência de hipermetilação nas amostras supracitadas, demonstrando que essa discordância entre *MLH1* e *BRAF* não está associada a epimutação germinativa.

A média de idade dos pacientes com hipermetilação em *MLH1* foi comparada com os pacientes com perda de *MLH1*/*PMS2* não hipermetilados e com perda em *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* (Figura 10). O grupo dMMR *MLH1*/*PMS2* metilado apresenta uma média de idade superior ($p=0,003$), com 61,4 anos ($\pm 11,6$), em relação ao grupo *MLH1*/*PMS2* não-metilado (42,2 anos $\pm 13,4$ anos) e ao grupo *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* (50,6 anos $\pm 13,6$ anos) ($p=0,03$), indicando a ocorrência da metilação em pacientes mais velhos.

Figura 10. Distribuição da idade dos pacientes por grupo com deficiência MMR. O gráfico apresenta a distribuição das idades dos pacientes classificados em três grupos com deficiência no sistema MMR. Os grupos foram definidos conforme o perfil molecular: *MLH1*/*PMS2* Metilado, *MLH1*/*PMS2* Não-metilado e *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*. Cada grupo representa a densidade da distribuição de idade dentro de cada grupo, com inclusão de boxplots internos para visualização da mediana e dos quartis.



Fonte: autoria própria.

4.3 Investigação de mutações somáticas em genes MMR

A análise de CGP foi utilizada para a detecção de mutações pontuais em amostras tumorais, com o objetivo de identificar variações genéticas somáticas nos genes do sistema MMR associadas ao desenvolvimento da dMMR. A escolha dos painéis de sequenciamento (descritos no item 3.5 metodologia) para análise das amostras foi realizada em função da disponibilidade operacional dentro do fluxo de trabalho estabelecido no laboratório.

As 6 amostras com perda de MLH1/PMS2 que foram negativas para hipermetilação no promotor de *MLH1* e mutação de *BRAF*, e as demais 8 amostras com outros padrões de perda de MMR foram submetidas a investigação para a presença de mutações pontuais (SNVs e *indels*) de perda de função (LoF) e alterações de número de cópias (CNVs) (no caso do painel TSO) nos genes MMR, totalizando 14 casos avaliados com painéis ampliados, e em 13 casos tivemos resultados avaliáveis. No total, em 61,5% (8/13) dos casos foi possível encontrar variantes que explicassem a perda da IHQ a partir do sequenciamento.

Foram utilizados três painéis distintos onde: quatro (4/14) amostras foram processadas com o painel *TruSight Oncology 500* (TSO 500), nas quais foi possível avaliar também CNVs (SLL 12, SLL 17, SLL 21 e SLL 38); quatro (4/14) amostras foram processadas com o painel *Comprehensive Cancer Panel* (CCP), e seis (6/14) com o painel Oncomine Comprehensive Assay Plus (OCAplus), nas quais não foram avaliadas CNVs, somente SNVs e *indels*.

A Tabela 3 apresenta os dados clínicos e resultados desses pacientes, com predominância no diagnóstico de CCR (13 casos), e um caso com CE. Dentre eles, seis casos apresentaram perda de expressão de MLH1/PMS2 (6/14), cinco casos mostraram perda de expressão de MSH2/MSH6 (5/14), dois casos tiveram perda isolada de MSH6 (2/14) e apenas um caso apresentou perda isolada de PMS2 (1/14).

Em 4/6 casos com perda de MLH1/PMS2 foram detectadas variações somáticas pontuais de perda de função e/ou perda de heterozigosidade (LoH) no gene *MLH1*, conforme detalhado na Tabela 3. Um caso apresentou falha (SLL 23) na análise de painel, por qualidade insuficiente do DNA, e um caso não apresentou mutações detectadas em *MLH1* que explicassem o padrão principal de dMMR (SLL 25).

Dentre os casos com mutação, em dois casos foi observada inativação bialélica de

MLH1: o caso SLL 8 (CCR, M, 48) com duas mutações pontuais de LoF por efeito em *splicing*. O sequenciamento identificou as variantes c.790+1G>A (VAF 32%) e c.1038G>A, p.Gln346= (VAF 26%). A variante *MLH1* c.1038G>A, apesar de ser uma variante sinônima (sem troca de aminoácido), está localizada na última base do éxon 11, apresenta alta probabilidade de impacto no *splicing* segundo o SpliceAI (score 0,88) e é classificada como patogênica no ClinVar.

Já para o caso SLL 12 (CCR, M, 25) apresentou uma mutação pontual no gene *MLH1* c.991G>T; p.Glu331* (VAF 63,1%). Essa mutação leva um *códon* de parada prematuro, levando a formação da proteína truncada, com perda de função. Além da VAF de 63,1% da variante somática, essa amostra apresentou um VAF de 83,3% para um SNP germinativo em *MLH1* (*MLH1*:c.-93G>A) e uma VAF de 71,5% para a mutação somática p.(Ser45Phe) no gene *CTNNB1*, localizado próximo ao *MLH1*. A análise de CNV da região no TSO não indicou alteração de número de cópias de *MLH1* (razão 2,2), indicando que pode ter ocorrido um evento de perda do alelo selvagem (LoH) *copy number neutral* (cnLOH), caracterizando o evento bialélico de inativação de *MLH1*.

Nas amostras SLL 9 e SLL 14, foi identificada uma única mutação somática em *MLH1*. A amostra SLL 9 (CCR, F, 34) apresentou a variante c.2047_2060del; p.(Phe683Glufs*6) (VAF 40%), enquanto a amostra SLL 14 (CCR, M, 60) apresentou a variante c.2252_2253del; p.(Lys751Serfs*3) (VAF 37%). Ambas as variantes são mutações *frameshift* que resultam em truncagem precoce da proteína *MLH1*, resultando em perda de função. No entanto, o painel utilizado nessas amostras não permite a detecção de CNV, e as VAFs encontradas não permitem a conclusão sobre ocorrência de LoH, motivos pelo quais os casos foram considerados monoalélicos.

O caso SLL 25 (CCR, F, 63) apresentava como padrão de IHQ a perda de expressão de MLH1/PMS2, com expressão aberrante na enzima MSH6. A partir do painel detectamos somente uma variante no gene *MSH6* c.2413dupA; p.Ile805Asnfs*15 (VAF 11%), trata-se de uma mutação *frameshift* que leva à truncagem da proteína, sendo classificada como patogênica. No entanto, apesar da presença dessa alteração em *MSH6* com baixa frequência, não foi observada mutação em *MLH1* ou *PMS2*. Este caso permanece como u-dMMR, uma vez que não foi possível obter RNA para a análise seguinte.

O último caso com perda de MLH1/PMS2, trata-se do caso SLL 23 (CCR, M, 44), para esse caso não foi possível confirmar a presença de variantes somáticas nos genes

correspondentes, uma vez que o sequenciamento falhou para essa amostra. Atribuímos essa falha a baixa qualidade e do rendimento do material coletado em 2019, o que pode ter comprometido a integridade do DNA (DIN = 1,4). A ausência de material adicional inviabilizou a repetição do procedimento ou solicitar uma nova amostra ao biobanco, configurando um fator limitante dos estudos retrospectivos.

Para os casos onde houve perda de MSH2/MSH6 (5/14) foram identificadas alterações genéticas bialélicas em 2 casos, monoalélica em 1 caso, e em 2/5 amostras não foram encontradas variantes que explicassem a dMMR, as quais serão detalhadas a seguir.

O caso SLL 2 (CCR, F, 62) apresentou duas mutações somáticas no gene *MSH2*, compatíveis com inativação bialélica. A primeira variante, c.351G>A; p.(Trp117*) (VAF 27%), é uma mutação *nonsense* que resulta em um códon de parada prematuro, levando à truncagem da proteína. Já a segunda variante, c.1738G>T; p.(Glu580*), (VAF 13%), também é uma mutação *nonsense*, reforçando o comprometimento funcional do gene *MSH2*. A presença de duas variantes truncadas em diferentes posições do gene, mesmo com VAFs moderadas, é consistente com um evento bialélico de inativação, contribuindo para a dMMR.

No caso SLL 38 (CCR, F, 48) foram identificadas duas mutações somáticas no gene *MSH2*, compatíveis com inativação bialélica. A primeira variante, c.1046_1055delinsGG; p.(Pro349Argfs*2) (VAF 19%) corresponde a uma mutação *frameshift* que leva à geração de um códon de parada prematuro, resultando em truncagem da proteína. A segunda variante, c.307del; p.(Tyr103Ilefs*71) (VAF 29%), também é uma mutação *frameshift* com efeito semelhante, comprometendo a integridade funcional da proteína *MSH2*. As presenças simultâneas dessas duas mutações confirmam um evento bialélico de inativação, o que é consistente para explicar a dMMR.

O terceiro caso, SLL 34 (CE, F, 55), apresentou duas variantes patogênicas em dois genes do sistema MMR. Foi identificada uma mutação *frameshift* no gene *MSH2*: c.1102G>T; p.(Thr367Leufs*2) (VAF 45%), que resulta em *truncagem* precoce da proteína, comprometendo sua função. Simultaneamente, foi detectada uma mutação também, *frameshift* no gene *MSH6*: c.1897delA; p.(Thr633Leufs*2) (VAF 52%), resultando na perda funcional da proteína. De acordo com o painel utilizado, não foi possível detectar CNV e as VAFs nos genes *MSH2* e *MSH6* estão abaixo do *cut-off* de 65%, deste modo não podemos concluir sobre ocorrência de LoH, portanto, o caso foi considerado monoalélico.

Dois casos apresentaram perda isolada de MSH6 (SLL 17 e SLL 40). Para o caso SLL 17 (CCR, F, 54) apresentou uma variante patogênica *MSH6* c.742C>T; p.(Arg248*) (VAF 42,7%) onde houve uma substituição ocasionando um *stop codón* prematuro, levando a formação de uma proteína truncada. O sequenciamento pelo painel TSO permitiu avaliar a ocorrência de CNV nessa amostra, nesse caso apresentou em *MSH6* com *low noise* 1,5, com uma variante sinônima germinativa (c.3306T>A; p.(Thr1102=)) com VAF = 72%, evidenciando a ocorrência de cnLOH.

O outro caso com perda isolada em MSH6, caso SLL 40 (CCR, F, 41) o sequenciamento não revelou nenhuma variante que explicasse a perda de IHQ, permanecendo como um caso inexplicado, seguindo para próxima etapa de sequenciamento do RNA constitutivo.

O caso SLL 37 (CCR, F, 77) único caso na coorte com perda isolada de PMS2, foi encontrado uma variante em *MLH1* (c.305A>G, p.Glu102Gly) (VAF 16%) onde houve uma substituição de A por G, resultando em uma variante *missense*. Atualmente, essa variante está classificada como VUS no ClinVar. A predição in silico dessa variante é de ser provavelmente danosa, com escores de 0.97 no Revel, 0.99 no AlphaMissense e de ter impacto no *splice* (SpliceAI *acceptor loss* 0.5 e *donor loss* 0.58). Duas outras variantes nesse códon estão classificadas no ClinVar, uma como patogênica (p.Glu102Lys) e outra como *Conflicting* (p.Glu102Ala – classificada como provavelmente patogênica por 1 laboratório). Nesse caso, é possível que a variante seja danosa, porém produza uma proteína MLH1 ainda reconhecida pelo anticorpo na imuno-histoquímica, levando ao padrão de perda apenas do PMS2. No entanto, devido a classificação ainda conflitante da variante, sua baixa VAF e o padrão da imuno-histoquímica, consideramos que o caso permanece inexplicado, uma vez que não foi possível realizar as próximas análises (análise de RNA) por falta de material correspondente.

Para três casos (SLL 8, SLL 9, SLL 12) com mutações somáticas detectadas e para os quais havia disponibilidade de tecido normal adjacente ao tumor, as variantes somáticas identificadas por meio do perfil CGP foram avaliadas também no tecido não neoplásico, para investigação de possível mosaicismo genético. A ausência dessas variantes no material adjacente ao tumor foi confirmada nos três casos, permitindo, assim, a exclusão da hipótese de mosaicismo genético, exposto na tabela 3.

Por fim, para 5 de 13 u-dMMR casos avaliados com os painéis CGPs não foram

identificadas variantes somáticas que explicassem o fenótipo MMR. Dentre esses, 3 casos foi possível realizamos o sequenciamento de RNA constitutivo. Para 2 casos, SLL 25 (CCR, F, 63, IHQ-MLH1/PMS2) e SLL 37 (CCR, F, 77, PMS2), que não apresentaram mutações que explicassem de forma definitiva a perda da imuno-histoquímica, não foram avaliados para análise de RNA por falta de material disponível no biobanco da instituição e impossibilidade de recrutamento.

Tabela 3 – Resultados do sequenciamento somático das amostras com perda inexplicada das proteínas do sistema MMR

ID	Tipo do tumor	Sexo	Idade Diag.	Outros primários	Histórico Familiar	IHQ dMMR	% de tumor	PAINEL	Análise de CGP	VAF	Status
SLL 2	CCR	F	62	Tumor neuroendócrino gástrico (60)	Pai CA (81); Irmãos CA de peq. células de pulmão (60); Tio paterno CA estômago (75); Tio paterno CA pulmão (45); Tia materna CA mama (55)	MSH2/MSH6	70%	OCAPLUS	MSH2 c.351G>A; p.Trp117Ter MSH2 c.1738G>T; p.Glu580Ter	27% 13%	Esporádico (somático bialélico)
SLL 8	CCR	M	48	Não	Pai CCR (65)	MLH1/ PMS2	60%	CCP	MLH1 c.790+1G>A; MLH1 c.1038G>A p.Gln346= (sinônima P ClinVar)	32% 28%	Esporádico (somático bialélico) Mosaicismo excluído
SLL9	CCR	F	34	Não	Irmão com melanoma; avó materna com neo de ovário; avó paterna com neo de cólon; pai com neo de próstata	MLH1/ PMS2	70%	CCP	MLH1 c.2047_2060del; p.(Phe683Glufs*6)	40%	Esporádico (somático monoalélico) Mosaicismo excluído
SLL 11	CCR	F	38	Não	Negativo	MSH2/MSH6	50%	CCP	Negativo	-	Investigação por RNA
SLL 12	CCR	M	25	Não	Prima materna CCR	MLH1/ PMS2	60%	OCAPLUS	MLH1 c.991G>T; p.(Glu331Ter)	63%	Esporádico (somático bialélico [cnLOH]) Mosaicismo excluído.
SLL 14	CCR	M	60	Não	Tio paterno Ca colón	MLH1/ PMS2	70%	CCP	MLH1 c.2252_2253del; p.(Lys751Serfs*3)	37%	Esporádico (somático monoalélico)
SLL 17	CCR	F	54	Não	Tias paternas e materna com ca de mama	MSH6	50%	TSO	MSH6 c.742C>T; p.(Arg248Ter)	43%	Esporádico (somático bialélico [cnLOH])
SLL 21	CCR	M	32	Não	Irmã múltiplos carcinomas; tio materno C pâncreas (69); tia materna CA de fígado (56); tia paterna CA de pulmão (45)	MSH2/MSH6	50%	TSO	Negativo	-	Investigação por RNA
SLL 23	CCR	M	44	Tumor neuroendócrino de reto (44)	Pai tumor de laringe e faringe; tia tumor de mama e avó tumor de pele de coxa	MLH1/PMS2	80%	OCAPLUS	Falha		
SLL 25	CCR	F	63	Não	Pai CA no rim	MLH1/ PMS2 + perda heterogênea de MSH6	60%	OCAPLUS	MSH6 c.2413dupA; p.Ile805Asnfs*15	11%	Segue u-dMMR ausência de material (RNA)
SLL 34	CE	F	55	Não	Negativo	MSH2/MSH6	40%	OCAPLUS	MSH2 c.1102G>T; Thr367Leufs*2; MSH6 c.1897delA; p.Thr633Leufs*2	45% 52%	Esporádico (somático monoalélico)
SLL 37	CCR	F	77	Não	Irmã CA estômago	PMS2	80%	OCAPLUS	MLH1 c.305A>G, p.Glu102Gly (VUS)	16%	Segue u-dMMR ausência de material (RNA)
SLL 38	CCR	F	46	Não	Irmã com CA ovário	MSH2/MSH6	50%	TSO	MSH2 c.1046_1055delinsGG; p.(Pro349Argfs*2); MSH2 c.307del; p.(Tyr103Ilefs*71)	19% 29%	Esporádico (somático bialélico)
SLL 40	CCR	F	41	Não	Negativo	MSH6	40%	OCAPLUS	Negativo	-	Investigação por RNA

Fonte:autoria própria.

Legenda: CCR – Câncer colorretal; CE – Câncer de endométrio; F – Feminino; M – Masculino; CA – Câncer; VUS – Variante de significado incerto; IHQ – Imunohistoquímica; VAF - Frequência de alelo variante;.

4.4 Investigação de mutações germinativas no RNA constitutivo

O sequenciamento de RNA foi incluído em nossas análises para tentar identificar eventos de *splicing* incorretos causados por potenciais variantes *intrônicas* profundas ou rearranjos complexos não identificadas nos testes genéticos convencionais de DNA. Essa avaliação foi realizada através do teste de RNACap e *pipeline in house* validados pela doutora Larissa Dias Souza, integrante do grupo de pesquisa, em sua tese de doutorado (Souza, 2025).

Para essa etapa foram sequenciadas 3 amostras: SLL 11 (CCR, F, 38 IHQ-MSH2/MSH6), SLL 21 (CCR, M, 32, IHQ-MSH2/MSH6), SLL 40 (CCR, 41, F, IHQ-MSH6) seguindo o protocolo descrito na metodologia no item 3.6. As informações gerais sobre a qualidade do sequenciamento estão disponíveis na tabela 4.

Tabela 4 - Informações e métricas do sequenciamento de RNA

Id	IHQ dMMR	Tecido	Gene	Média de Cobertura	Cob. 50X (%)
SLL 11	MSH2/MSH6	Sangue	<i>MLH1</i>	5015	100%
			<i>MSH2</i>	6796	100%
			<i>MSH6</i>	2685	100%
			<i>PMS2</i>	5274	100%
SLL 21	MSH2/MSH6	Tecido normal de cólon	<i>MLH1</i>	4211	100%
			<i>MSH2</i>	4993	100%
			<i>MSH6</i>	1683	100%
			<i>PMS2</i>	4795	100%
SLL 40	MSH6	Tecido normal de cólon	<i>MLH1</i>	2005	100%
			<i>MSH2</i>	2130	100%
			<i>MSH6</i>	1020	100%
			<i>PMS2</i>	3400	98%

Fonte: autoria própria.

Os eventos de *splicing* dos 3 pacientes para os genes de interesse (*MSH2* e *MSH6*) foram comparados com os eventos de *splicing* de 217 controles, através do software rMATS. Não foram identificados eventos significativos com os *cut-offs* estabelecidos e descritos no item Metodologia. Realizamos também uma inspeção visual dos alinhamentos dos genes de interesse no *software* IGV, e não foram identificados padrões ou eventos relevantes.

5. DISCUSSÃO

A deficiência no sistema de reparo de pareamento do DNA (dMMR) é um marcador molecular importante, especialmente no contexto do câncer colorretal e de endométrio, estando frequentemente associada à presença de instabilidade de microssatélites (MSI). Tais biomarcadores são utilizados como triagem para detectar pacientes com a Síndrome de Lynch (SL) e para indicação de tratamento com imunoterapia.

Aproximadamente 1 em cada 35 pacientes com CCR apresenta SL, definida pela presença de uma alteração patogênica da linha germinativa em um gene MMR (*MLH1*, *PMS2*, *MSH2* ou *MSH6*), ou por deleções no gene *EPCAM*, tornando essa síndrome a forma hereditária mais comum no desenvolvimento do CCR. No entanto, a grande maioria dos carcinomas colorretais com deficiência nas proteínas MMR surge devido à hipermetilação somática de ilhas CpG no promotor de *MLH1* (Awosika, Gulley e Pastor, 2025). Ainda assim, existem pacientes com perfil dMMR que não apresentam alterações epigenéticas somáticas ou alterações germinativas nos genes MMR (u-dMMR).

Neste estudo, foram investigados pacientes com suspeita de deficiência inexplicada do sistema MMR no banco de dados do ACCC, com o objetivo de identificar possíveis mecanismos somáticos e germinativos raros que possam levar à inativação das enzimas MMR. Com base na nossa coorte clínica, foi possível identificar 50 pacientes que apresentavam perda de expressão das proteínas do sistema MMR, em tumores como câncer colorretal, câncer de endométrio e câncer gástrico, os quais apresentavam teste genético negativo para variantes germinativas patogênicas. A partir desse levantamento, foram solicitadas as amostras para o biobanco/arquivo de anatomia patológica, apresentando 38 amostras disponíveis para a investigação.

Para investigar a perda das enzimas MMR, iniciou-se pela análise de hipermetilação do promotor de *MLH1*, no qual foram testados 30 pacientes (CCR, com IHQ *MLH1/PMS2*). Para esses casos, 24 (80%) apresentaram hipermetilação do promotor de *MLH1*, explicando a causa de inativação do sistema MMR, enquanto 6 (20%) casos seguiram para as próximas etapas de investigação (em conjunto com outros 8 casos com outros padrões de dMMR).

No carcinoma colorretal, a mutação *BRAF* está frequentemente associada à hipermetilação do promotor de *MLH1*, sendo muito raramente identificada em tumores de pacientes com SL. A correlação entre *BRAF* mutado e dMMR, além de sugerir uma

causa esporádica, também está relacionada a parâmetros de risco prognóstico para câncer metastático, uma vez que, tais condições estão relacionadas a baixa sobrevida (Awosika, Gulley e Pastor, 2025).

Em nossos resultados de análise do promotor de *MLH1*, nos casos de CCR (20/30) identificamos 14 pacientes positivos para essa análise, sendo que entre eles a correlação dos casos hipermetilados e com *BRAF* mutados foi identificada em 8/14 pacientes (57%), enquanto 6/14 não apresentaram essa correlação (42%). Ressaltamos que excluímos epimutação constitucional em *MLH1* por meio da análise de leucócitos, confirmando que a metilação observada nesses casos são somáticas. Na literatura, um levantamento de 35 estudos apontou uma frequência de 63,5% de *BRAF* V600E em pacientes com CCR e hipermetilação de *MLH1*, especialmente em países ocidentais (Parsons, et al, 2012), indicando que 36,5% dos casos se apresentam sem essa mutação. Assim como o estudo de Farchoukh, et al, (2016) também relatam que entre 30% e 50% dos CCRs com hipermetilação de *MLH1* não apresentam *BRAF* V600E.

Embora a correlação entre dMMR/*MLH1* e *BRAF* seja amplamente aceita, estudos como o de Moreira, et al, (2014) destacam a complexidade dessa relação. Para eles, os pacientes com perda de *MLH1* na IHQ foram divididos em três grupos: (I) com síndrome de Lynch, (II) com *BRAF* mutado e (III) com *BRAF*^{wt} sem alterações germinativas. Os autores observaram que 92% dos tumores MSI/*BRAF*^{mut} apresentavam hipermetilação de *MLH1*, em contraste com 62% dos tumores MSI/*BRAF*^{wt}, e somente 15,8% dos tumores dos pacientes com Síndrome de Lynch. O estudo também ressalta as limitações dos painéis convencionais, que podem não detectar variantes germinativas fora das regiões-alvo padrão.

Em nossos achados investigamos a discordância observada entre *BRAF*^{wt} e perda de *MLH1* por hipermetilação, analisando os painéis genéticos realizados na triagem clínica. Identificamos a presença de mutações hotspot em *KRAS* em dois casos com *BRAF*^{wt}, e um terceiro com análise inconclusiva. Estudos como os de Farchoukh, et al, (2016), Lin, et al, (2019), Midthun, et al, (2019) e Kim, et al, (2018) apontam que mutações em *KRAS* podem ocorrer em CCRs MSI-H e dMMR, com proporções variáveis entre 5% e 47%. Essas mutações que geralmente são mutuamente exclusivas com *BRAF*, estão associadas à resistência a terapias anti-*EGFR* e a pior prognóstico. A ausência de mutações simultâneas em *BRAF* e *RAS* pode ser explicada pela ativação da via *RAS*-*RAF*-*MEK*-*ERK*.

As diretrizes recomendam triagem universal para pacientes com perda de *MLH1*, incluindo testes para mutação *BRAF* V600E ou hipermetilação do promotor de *MLH1*, visando excluir SL. No entanto, pela facilidade da análise e maior sensibilidade, geralmente a avaliação da mutação *BRAF* V600E é mais utilizada do que a avaliação de hipermetilação. Nossos resultados e de outros trabalhos demonstram que uma porcentagem variada de casos negativos para *BRAF* podem apresentar metilação somática de *MLH1*.

Ainda, como discutido por Moreira, et al, (2014), a presença de hipermetilação somática não exclui completamente a possibilidade de um segundo hit germinativo em SL, o que levanta questionamentos sobre seu uso como preditor negativo de mutações germinativas. Um estudo publicado em nosso grupo de pesquisa (Silva, et al, 2020) descreveu um caso em que uma paciente diagnosticada com SL apresentava hipermetilação do promotor de *MLH1*, embora em baixa porcentagem (11%), e também apresentava *BRAF*^{wt}. Nesse caso, a mutação *BRAF* apresenta-se como um preditor mais sensível para excluir a suspeita para SL. Mas vale ressaltar, que a frequência de mutação *BRAF* pode apresentar variações entre as etnias (Wang, et al, 2021).

Nos 14 casos classificados como u-dMMR (negativos para hipermetilação do promotor de *MLH1* e *BRAF* ou com perda de *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*), realizamos sequenciamento somático amplo. Dentre eles, 1 apresentou falha no sequenciamento e foi desconsiderado, e 5 não apresentaram variantes identificadas nos genes de interesse. A partir do sequenciamento tumoral dos casos, foi possível identificar mutações somáticas capaz de explicar o padrão de perda da IHQ em 8/13 casos, totalizando 61,5% dos casos analisados. Quatro alterações foram detectadas em *MLH1* (50%), 2 em *MSH2* (25%), 1 em *MSH6* (12,5%), 1 caso apresentou variante em ambos os genes *MSH2/MSH6* (12,5%). Esses dados demonstram uma maior prevalência de variantes em *MLH1*, seguido por *MSH2* e *MSH6*, reforçando o papel desses genes na deficiência do sistema MMR em tumores analisados.

Dentre os 13 casos avaliados, 38,5% apresentavam alterações bialélicas (5/13) e 23,1% monoalélicas (3/13). Haraldsdottir, et al, (2014) identificara uma proporção com aproximadamente 69% de mutações somáticas bialélicas em 32 casos de u-dMMR, sugerindo que a maioria dos casos classificados como “inexplicados” podem, na verdade, ser atribuídos a mutações somáticas bialélicas nos genes MMR (Haraldsdottir, et al, 2014).

Um estudo de revisão realizada por Eikenboom e colaboradores (2023) identificou variantes monoalélicas em 52% (39/74). Já Jantet, et al, (2022) publicaram uma taxa de 43% para mutações somáticas bialélicas, em que cerca da metade dos casos u-dMMR são explicados por ocorrência de dois hits (Janet, et al, 2020). Essa proporção é consistente com os valores de Eikenboom, et al, (2023) de aproximadamente 50%, bem como os resultados encontrados em nossa coorte.

Para os nossos resultados com variantes bialélicas, dois casos apresentaram alterações nos genes *MLH1*, dois em *MSH2* e um em *MSH6*. Em 3 casos, duas variantes pontuais patogênicas foram identificadas, enquanto nos outros dois casos foram identificados uma variante pontual patogênica e um evento de cnLOH.

Um caso interessante com duas variantes patogênicas foi o SLL 8 (CCR, 48, IHQ-MLH1/PMS2), que apresentou as variantes em *MLH1* *c.790+1G>A* e *c.1038G>A p.Gln346=* (sinônima com efeito em *splicing*). A variante sinônima localiza-se na última base do éxon 11, o que a torna relevante do ponto de vista funcional. A predição realizada pela ferramenta *SpliceAI* indicou alta probabilidade de impacto no *splicing* (pontuação de 0,88 para perda de sítio doador), sugerindo um efeito patogênico. Corroborando para essa interpretação, bases de dados clínicos como *ClinVar* e *InSiGHT* classificam essa variante como patogênica, com evidências de que seu efeito de *splicing* resulta na inclusão de 59 nucleotídeos do *ítron* 11, promovendo um evento *frameshift* com impacto funcional significativo na proteína codificada. Sendo assim, é possível interpretar essa variante como patogênica.

O paciente SLL 12 (CCR, 25, IHQ-MLH1/PMS2) apresentou uma variante somática do tipo *nonsense* (*MLH1* p.Glu331Ter) acompanhada de cnLOH. Um segundo caso (SLL 17 - CCR, F, 54, IHQ-MSH6) também apresentou cnLOH em conjunto com uma variante patogênica de ponto em *MSH6* (*c.742C>T*; p.(Arg248Ter) - VAF 42,7%). Ambos os casos foram avaliados com o painel TSO, que permitiu avaliar a ocorrência de CNV, que foi negativa. Ainda, ambos apresentavam variantes germinativas nos genes alterados que apresentaram VAFs > 65%, evidenciando a ocorrência de cnLOH.

A cnLOH é um mecanismo que resulta na inativação de genes supressores de tumor, bem como na ativação de oncogenes e ocorre quando, após a inativação ou ativação mutacional inicial de um alelo, o alelo selvagem restante é deletado ao mesmo tempo em que o alelo mutado é duplicado, o que difere das deleções clássicas que ocasionam a LOH (Melcher et al, 2011). Assim, cnLOH é um mecanismo de inativação

gênica no qual não há perda ou ganho de número de cópias, resultando em LOH sem alteração de CNV aparente. Na prática diagnóstica, a cnLOH pode ser inferida por SNP-array com segmentos longos de homozigose sem variação de número de cópias ou por NGS por análise de VAF em regiões com alta densidade de SNPs, onde VAFs tumorais próximas a 0,7/0,3 em variantes constitutivas sugerem na ausência de CNVs sugerem cnLOH (Tapial et al, 2021).

Para os casos com mutações bialélicas em MMR, a presença de LOH (com ou sem CNV) ocorre em uma grande parcela dos casos avaliados, como demonstrado por Geurts-Giele, et al, (2014) que 40% (16/40) dos casos apresentavam uma mutação patogênica com a presença de LOH, confirmando que essa é uma via comum de inativação. Deste modo, os autores recomendam, a inclusão da análise de mutações somáticas e de LOH no fluxo diagnóstico da SL, para diferenciar com mais precisão os casos hereditários dos esporádicos.

Para os casos em que houve mutação monoalélica nos genes MMR, esses resultados podem estar associados a uma limitação dos painéis somáticos utilizados, que não permitem refletir a totalidade das alterações do tumor, como os dois painéis que não avaliam CNVs, ou também o fato de a segunda mutação poder ocorrer em regiões não cobertas pelos painéis. A ausência de detecção da LOH ou do segundo hit identificável não exclui a possibilidade de inativação do gene. Deste modo, a investigação completa dos genes MMR pode explicar boa parte dos casos de u-dMMR, assumindo que as alterações monoalélicas são indicativos da existência de outro hit não identificado no tumor ou na linhagem germinativa (Eikenboom et al, 2023). Em nossos resultados, em 3/8 pacientes detectamos variantes monoalélicas, não podendo afirmar que não há outro hit no alelo em regiões não analisadas como por exemplo, CNV não detectadas ou mutações em regiões não codificantes que afetam a expressão do gene MMR.

Em nossa coorte também identificamos um caso com variantes patogênicas em dois genes MMR: a paciente SLL 34 (CE, 55, IHQ-MSH2/MSH6) na qual foram detectadas variantes nos genes *MSH2* (p.Thr633Leufs*2 – VAF 45%) e no gene *MSH6* (p.Thr633Leufs*2 – VAF 52%). Uma das mutações pode representar um evento decorrente da instabilidade genômica já ocasionada pela perda inicial de um dos genes MMR, no entanto, devido à alta VAF das duas mutações, não é possível pressupor qual evento ocorreu primeiro.

Já um segundo caso, o SLL 25 (CCR, 63), apresentou um padrão de perda

complexa na IHQ, com perda completa de MLH1/PMS2 e uma perda heterogênea de MSH6. Nesse caso, não identificamos qual o evento causador da perda de MLH1/PMS2, mas identificamos uma mutação somática em *MSH6* (c.2413dupA; p.Ile805Asnfs*15) com VAF de 11%. Essa baixa frequência alélica pode indicar que se trata de um evento subclonal, secundário à instabilidade causada pela perda de MLH1/PMS2, e que explica o padrão heterogêneo da perda de MSH6.

Mesmo sendo casos esporádicos, a metade dos pacientes (4/8) com mutações somáticas em MMR apresentavam menos de 50 anos e histórico familiar sugestivo de predisposição hereditária, com parentes de primeiro grau diagnosticados com cânceres relacionados à síndrome de Lynch (principalmente CCR e, em menor frequência, câncer de ovário e estômago). Esses achados estão de acordo com o estudo de Lefol, et al, (2020), que investigou pacientes com u-dMMR e sem variantes germinativas detectáveis. Nesse artigo eles identificaram pacientes com variante bialélicas com idade média de 54 anos com semelhanças clínicas com SL, denominados em “*non-promotor hypermethylation related MSI-H sporadic patients*”. Assim como o estudo de Lefol, et al, (2020), citam que existem muitos outros mecanismos que podem estar relacionados a essas variantes, como modificadores genéticos ou fatores ambientais, e interações com outros genes do câncer, como por exemplo *POLE*, *PTEN* e *APC*.

Em três dos nossos casos (com CCRs desenvolvidos ao 25, 34 e 48 anos) realizamos a análise do tecido colônico normal adjacente ao tumor, confirmando a ausência das alterações somáticas nesses tecidos e descartando a hipótese de mosaicismo somático. Embora incomum, o mosaicismo genético em genes MMR é causa reconhecida de casos antes considerados u-dMMR e poderia ser uma explicação para alguns casos com diagnóstico em idade jovem. Casos *index* com mutações em *MLH1* e *MSH2* detectadas em mosaico já foram descritos, com VAFs variáveis entre tecidos e apresentação precoce de CCR ou EC (Geurts-Giele et al, 2019; Guillermin et al, 2020). Havendo uma suspeita clínica de mosaicismo, recomenda-se a análise de múltiplos tecidos (sangue, raspado oral, mucosa intestinal, folículos pilosos, etc) com sequenciamento de alta profundidade ou PCR digital (Jansen e Goel, 2020). Essa avaliação pode levar ao diagnóstico correto de síndrome de Lynch em um paciente inicialmente considerado esporádico, e ter implicações no aconselhamento genético, rastreamento e prevenção de novos tumores e escolhas reprodutivas.

De acordo com nossos resultados, assim como em estudos recentes, os casos u-

dMMR, devem antes de tudo passar por investigações somáticas completas para definir o diagnóstico, para assim, diminuir o número de casos inexplicáveis.

Para os nossos casos sem detecção de variantes somáticas, a investigação prosseguiu com o sequenciamento germinativo de RNA, visando identificar possíveis causas germinativas raras de inativação das enzimas MMR. Nessa etapa, foram avaliados três pacientes cujos resultados de CGP foram negativos e tinham material biológico para RNA disponível ou pudessem ser recrutados, sendo eles SLL 11 (CCR, F, 38, IHQ-MSH2/MSH6), SLL 21 (CCR, M, 32, IHQ-MSH2/MSH6) e SLL 40 (CCR, F, 41, IHQ-MSH6). As análises comparativas de padrões de *splicing* dos genes *MSH2* e *MSH6* das três amostras e a inspeção visual dos alinhamentos não evidenciaram eventos significativos em relação às amostras controle. Infelizmente nenhum dos três pacientes avaliados possuía polimorfismos em heterozigose na região codificante desses 2 genes que permitissem a avaliação de desbalanço de expressão alélica. Diante disso, consideramos o sequenciamento de RNA como tendo um resultado negativo.

Em cenários de u-dMMR, variantes *intrônicas* profundas e alterações estruturais podem comprometer o *splicing* sem serem capturadas por painéis de DNA convencionais. A incorporação de RNA-seq ao fluxo diagnóstico permite evidenciar eventos como *exon skipping*, inclusão de *pseudoxons*, uso de sítios crípticos e desbalanço alélico, viabilizando a identificação ou suspeição de variantes germinativas novas (Kremer et al, 2017). Assim, a análise de RNA pode revelar mecanismos de inativação gênica não detectáveis por painéis de DNA, contribuindo para o esclarecimento da deficiência em MMR observada nesses casos (Fulk, et al, 2022). De forma complementar, o sequenciamento do genoma completo (WGS) aumenta a detecção de rearranjos estruturais, pequenas deleções/duplicações *intrônicas* e alterações em regiões repetitivas/promotoras não adequadamente cobertas por painéis, solucionando parte dos casos u-dMMR e CGP negativo (Eikenboom, et al, 2022, Horti-Oravec, et al, 2025). Assim, a combinação de RNA-seq + WGS pode elevar o rendimento etiológico, discrimina causas hereditárias de somáticas e orienta o aconselhamento familiar e o manejo clínico, sobretudo quando a suspeita de Lynch persiste apesar de testes de primeira linha negativos (Te Paske, et al, 2022; Llargués-Sistac, et al, 2025). Nesse sentido, nosso grupo irá realizar sequenciamento de genoma de *long-reads* para os cinco casos que permaneceram como u-dMMR.

Este estudo apresenta limitações metodológicas que devem ser consideradas na

interpretação dos resultados. A indisponibilidade de material tumoral para uma parcela da coorte comprometeu a inclusão de determinados casos nas análises moleculares, reduzindo o poder estatístico e a representatividade da amostra. Além disso, os painéis de sequenciamento utilizados (CCP e OCAPlus), por serem baseados em *amplicons*, não permitem a detecção de variações no número de cópias (CNVs), restringindo a caracterização genômica dos tumores. Observou-se também a identificação de apenas uma variante em diversos casos, o que pode refletir limitações na sensibilidade dos métodos empregados ou a maior complexidade mutacional de determinadas amostras, dificultando inferências mais precisas sobre os mecanismos moleculares envolvidos.

Os resultados obtidos nesse estudo reforçam a heterogeneidade dos tumores deficientes no sistema MMR. Procedimentos de investigação para o diagnóstico de síndromes hereditárias, ou para classificação de casos somáticos ou germinativos, precisam ser orientados pela suspeita clínica e pela disponibilidade de investigações relevantes que complementem os achados da imuno-histoquímica e do sequenciamento germinativo. Notamos que, quando a investigação após o teste genético germinativo negativo é complementada por avaliações somáticas (análise de metilação do promotor e painel somático) a proporção de deficiência inexplicada de MMR é reduzida.

6. CONCLUSÃO

A avaliação de metilação em *MLH1* e do *BRAF* p.V600E mostrou-se importante para indicar etiologia esporádica mais comum em casos com perda de *MLH1/PMS2*, o que poderia evitar investigações germinativas e somáticas desnecessárias.

Evidência de mecanismos somáticos bialélicos em MMR a partir da avaliação do sequenciamento somático revelou que uma fração relevante dos casos u-dMMR decorre de mutações somáticas bialélicas ou potencialmente bialélicas no tumor (incluindo casos com cnLOH). Esse achado reforça a importância dessa investigação para reduzir a incerteza diagnóstica.

Para os casos persistentes como u-dMMR após sequenciamento somático, a adoção isolada do sequenciamento de RNA em três casos não identificou potenciais causas germinativas. No entanto, a adoção combinada de RNA-seq e WGS pode aumentar o rendimento diagnóstico, permitindo identificar casos raros de origem hereditária.

O estudo identificou, através de uma ampla triagem inicial e caracterização molecular de casos dMMR, a heterogeneidade dos tumores dMMR “inexplicados”, reforçando a necessidade de um fluxo escalonado que integre IHQ, análise de metilação de *MLH1* ou *BRAF* em casos específicos, análise germinativa de MMR, análise pareada somática tumoral e eventualmente análises de RNA e WGS, para reduzir casos inexplicados e orientar a decisão sobre testes complementares, aconselhamento genético, e seguimento oncológico.

7. REFERÊNCIAS

- Abedizadeh R, Majidi F, Khorasani HR, et al. Colorectal cancer: a comprehensive review of carcinogenesis, diagnosis, and novel strategies for classified treatments. *Cancer Metastasis Rev.* 2024;43:729–753. <https://doi.org/10.1007/s10555-023-10158-3>
- Andre, T., et al. (2015). Prognostic and predictive value of BRAF mutation in metastatic colorectal cancer: Results from the TRIBE study. *Annals of Oncology*, 26(1), 104–111. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdu374>
- Awosika, J. A., Gulley, J. L., & Pastor, D. M. (2025, May 6). Deficient mismatch repair and microsatellite instability in solid tumors. *International Journal of Molecular Sciences*, 26(9), 4394. <https://doi.org/10.3390/ijms26094394>
- Brazil, Ministry of Health. National Cancer Institute (INCA). Colon and rectal cancer [Internet]. 2023 [cited 2023 Apr 18]. Available from: <https://www.gov.br/inca/pt-br/assuntos/cancer/numeros/estimativa/sintese-de-resultados-e-comentarios/cancer-de-colon-e-recto>
- Carethers JM. Differentiating Lynch-like from Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2014 Mar;146(3):602–604. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.01.041>
- Cerretelli G, Ager A, Arends MJ, Frayling IM. Molecular pathology of Lynch syndrome. *J Pathol.* 2020;250:518–531.
- Chan AT, Giovannucci EL. Primary prevention of colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2029–2043.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2010.01.057>
- Cohen SA, Pritchard CA, Jarvik GP. Lynch Syndrome: From Screening to Diagnosis to Treatment in the Era of Modern Molecular Oncology. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2019. <https://doi.org/10.1146/083118-015406>
- Daca Alvarez M, Quintana I, Terradas M, Mur P, Balaguer F, Valle L. The inherited and familial component of early-onset colorectal cancer. *Cells.* 2021;10:710. <https://doi.org/10.3390/cells10030710>
- Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *Lancet.*

2019;394:1467–1480. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32319-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32319-0)

Eikenboom EL, Moen S, van Leeuwen L, et al. Unexplained mismatch repair deficiency: case closed. *HGG Adv* 2023 ;4:100167. doi: 10.1016/j.xhgg.2022.100167

Farchoukh L, Kuan SF, Dudley B, Brand R, Nikiforova M, Pai RK. MLH1-deficient Colorectal Carcinoma With Wild-type BRAF and MLH1 Promoter Hypermethylation Harbor KRAS Mutations and Arise From Conventional Adenomas. *Am J Surg Pathol*. 2016 Oct;40(10):1390-9. doi: 10.1097/PAS.0000000000000695. PMID: 27438990.

Farchoukh, Lama MD; Kuan, Shih-Fan MD, PhD; Dudley, Beth MS; Brand, Randall MD; Nikiforova, Marina M; Pai, Reetesh K. MD. MLH1-deficient Colorectal Carcinoma With Wild-type BRAF and MLH1 Promoter Hypermethylation Harbor KRAS Mutations and Arise From Conventional Adenomas. *The American Journal of Surgical Pathology* 40(10):p 1390-1399, October 2016. | DOI: 10.1097/PAS.0000000000000695

Fulk K, Turner M, Eppolito A, et al RNA sequencing uncovers clinically actionable germline intronic MSH2 variants in previously unresolved Lynch syndrome families *BMJ Case Reports* CP 2022;15:e249580. Doi: <https://doi.org/10.1136/bcr-2022-249580>

Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 2008 Oct;135(4):1079–1099. Doi: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.07.076>

Guillerm E, Svrcek M, Bardier-Dupas A, Basset N, Coulet F, Colas C. Molecular tumor testing in patients with Lynch-like syndrome reveals a de novo mosaic variant of a mismatch repair gene transmitted to offspring. *Eur J Hum Genet*. 2020 Nov;28(11):1624-1628. Doi: 10.1038/s41431-020-0689-6

Haraldsdottir, S., Hampel, H., Tomsic, J., Frankel, W. L., Pearlman, R., de la Chapelle, A., & Pritchard, C. C. (2014, December). Colorectal and endometrial cancers with mismatch repair deficiency can arise from somatic, rather than germline, mutations. *Gastroenterology*, **147**(6), 1308–1316.e1. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2014.08.041>

Hewish M, Lord C, Martin S, et al. Mismatch repair deficient colorectal cancer in the

era of personalized treatment. *Nat Rev Clin Oncol*. 2010;7:197–208.

<https://doi.org/10.1038/nrclinonc.2010.18>

Horti-Oravecz K, Bozsik A, Pócza T, Vereczkey I, Strausz T, Tóth E, Sedlackova T, Rusnakova D, Szemes T, Likó I, Oláh E, Butz H, Patócs A, Papp J, Grolmusz VK. Whole genome sequencing completes the molecular genetic testing workflow of patients with Lynch syndrome. *NPJ Genom Med*. 2025 Jan 18;10(1):5. doi: 10.1038/s41525-025-00461-z

Janet Vos, Fakkert IE, Spruijt L, Willems RW, Langenveld S, Mensenkamp AR, Leter EM, Nagtegaal ID, Ligtenberg MJL, Hoogerbrugge N; FINAL Group. Evaluation of yield and experiences of age-related molecular investigation for heritable and nonheritable causes of mismatch repair deficient colorectal cancer to identify Lynch syndrome. *Int J Cancer*. 2020 Oct 15;147(8):2150-2158. doi: 10.1002/ijc.33117

Jansen AML, Goel A. Mosaicism in Patients With Colorectal Cancer or Polyposis Syndromes: A Systematic Review. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2020 Aug;18(9):1949-1960. Doi: 10.1016/j.cgh.2020.02.049

Keum N, Giovannucci E. Global burden of colorectal cancer: emerging trends, risk factors and prevention strategies. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019;16:713–732. <https://doi.org/10.1038/s41575-019-0189-8>

Kim JH, Bae JM, Cho NY, Kang GH (2016) Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: implications in the serrated neoplasia pathway. *Oncotarget* 7(12): 14095–14111.

Kim, J. H., et al. (2009). Prognostic implications of genetic and epigenetic alterations in colorectal cancer. *Cancer Research*, 69(7), 2823–2830. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-4417>

Kremer LS, Bader DM, Mertes C, Kopajtich R, Pichler G, Iuso A, Haack TB, Graf E, Schwarzmayer T, Terrile C, et al. Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat Commun*. 2017;8:15824

Lefol, C., Sohier, E., Baudet, C. et al. Acquired somatic MMR deficiency is a major

cause of MSI tumor in patients suspected for “Lynch-like syndrome” including young patients. *Eur J Hum Genet* 29, 482–488 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41431-020-00778-6>

Li J, Ma X, Chakravarti D, Shalapour S, DePinho RA. Genetic and biological hallmarks of colorectal cancer. *Genes Dev.* 2021;35(11–12):787–820. <https://doi.org/10.1101/gad.348226.120>

Lin EI, Tseng LH, Gocke CD, Reil S, Le DT, Azad NS, Eshleman JR. Mutational profiling of colorectal cancers with microsatellite instability. *Oncotarget*. 2015 Dec 8;6(39):42334–44. doi: 10.18632/oncotarget.5997.

Llangués-Sistac, G., Bonjoch, L., Muñoz, J. et al. Germline structural variant as the cause of Lynch Syndrome in a family from Ecuador. *npj Genom. Med.* 10, 3 (2025). <https://doi.org/10.1038/s41525-025-00462-y>

Martínez-Roca A, Giner-Calabuig M, Murcia O, Castillejo A, Soto JL, García-Heredia A, Jover R. Lynch-like syndrome: potential mechanisms and management. *Cancers (Basel)*. 2022;14:1115. <https://doi.org/10.3390/cancers14051115>

McVeigh TP, Monahan KJ, Christopher J, et al. Extent of investigation and management of cases of ‘unexplained’ mismatch repair deficiency (u-dMMR): a UK Cancer Genetics Group consensus. *J Med Genet*. 2024 Mar 26. <https://doi.org/10.1136/jmg-2024-109886>

Midthun L, Shaheen S, Deisch J, Senthil M, Tsai J, Hsueh CT. Concomitant KRAS and BRAF mutations in colorectal cancer. *J Gastrointest Oncol*. 2019 Jun;10(3):577–581. doi: 10.21037/jgo.2019.01.10.

Moreira, L., Muñoz, J., Cuatrecasas, M., Quintanilla, I., Leoz, M. L., Carballal, S., Ocaña, T., et al. (2014). Prevalence of somatic MUTL homolog 1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome colorectal cancer. *Cancer*, 120(3), 481–488. <https://doi.org/10.1002/cncr.29190>

Muzi CD, Banegas MP, Guimarães RM. Colorectal cancer disparities in Latin America: Mortality trends 1990–2019 and a paradox association with human development. *PLoS One*. 2023;18(8):e0289675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0289675>

Olave MC, Graham RP. Mismatch repair deficiency: the what, how and why it is important. *Library Rev.* 2021;314–321. <https://doi.org/10.1002/gcc.23015>

Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012 Mar;49(3):151-7. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100714.

Pellat A, Netter J, Perkins G, Cohen R, Coulet F, Parc Y, et al. Lynch syndrome: what is new? *Bull Cancer.* 2019;106:647–655. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2018.10.009>

Ralph Melcher, Elena Hartmann, Waltraud Zopf, Sabine Herterich, Philipp Wilke, Ludwig Müller, Eduard Rosler, Theodor Kudlich, Oliver Al-Taie, Andreas Rosenwald, Tiemo Katzenberger, Bettina Scholtka, Stefan Seibold, Dorothee Rogoll, Wolfgang Scheppach, Michael Scheurlen, Hardi Lühns, LOH and copy neutral LOH (cnLOH) act as alternative mechanism in sporadic colorectal cancers with chromosomal and microsatellite instability, *Carcinogenesis*, Volume 32, Issue 4, April 2011, Pages 636–642, <https://doi.org/10.1093/carcin/bgr011>

Silva SIO, Domingos TA, Kupper BEC, De Brot L, Aguiar Junior S, Carraro DM, Torrezan GT. Amplicon-based NGS test for assessing MLH1 promoter methylation and its correlation with BRAF mutation in colorectal cancer patients. *Exp Mol Pathol.* 2023 Apr;130:104855. <https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2023.104855>

Taieb, J., et al. (2016). Prognostic value of BRAF and KRAS mutations in stage III colon cancer: Post hoc analysis of the PETACC-8 trial. *Journal of Clinical Oncology*, 34(15), 255–262. <https://doi.org/10.1200/JCO.2015.64.8738>

Tapial S, García JL, Corchete L, Holowatyj AN, Pérez J, Rueda D, Urioste M, González-Sarmiento R, Perea J. Copy neutral loss of heterozygosity (cnLOH) patterns in synchronous colorectal cancer. *Eur J Hum Genet.* 2021 Apr;29(4):709-713. Doi: 10.1038/s41431-020-00774-w

Te Paske IBAW, Mensenkamp AR, Neveling K; ERN-GENTURIS Lynch-Like Working Group; Hoogerbrugge N, Ligtenberg MJL, De Voer RM. Noncoding

Aberrations in Mismatch Repair Genes Underlie a Substantial Part of the Missing Heritability in Lynch Syndrome. *Gastroenterology*. 2022 Dec;163(6):1691-1694.e7. doi: 10.1053/j.gastro.2022.08.041

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle AL, Rüschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261–268.
<https://doi.org/10.1093/jnci/djh034>

W. Wang, J. Ying, S. Shi, Q. Ye, S. Zou, L. Dong, N. Lyu. A modified screening strategy for lynch syndrome among MLH1-deficient CRCs: analysis from consecutive Chinese patients in a single center. *Transl. Oncol.*, 14 (2021), p. 101049, 10.1016/j.tranon.2021.101049

W.R. Geurts-Giele, E.H. Rosenberg, A.V. Rens, M.E.V. Leerdam, W.N. Dinjens, F.E. Bleeker. Somatic mosaicism by a de novo MLH1 mutation as a cause of Lynch syndrome *Mol. Genet. Genomic Med.*, 7 (2019), p. e00699. Doi: <https://doi.org/10.1002/mgg3.699>

Ward RL, Dobbins TM, Lindor N, Rapkins RW, Hitchins M. Identification of constitutional MLH1 epimutations and promoter variants in colorectal cancer patients from the Colon Cancer Family Registry. *Genet Med*. 2013.
<https://doi.org/10.1038/gim.2012.91>