

ESTUDO DE MUTAÇÕES NOS GENES
hMLH1 E *hMSH2* EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS
COM SUSPEITA DE CÂNCER COLORRETAL
HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE

Benedito Mauro Rossi

Tese apresentada à Fundação Antonio
Prudente para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Dr. Andrew J. G. Simpson

São Paulo
2000



FUNDAÇÃO ANTONIO
PRUDENTE
BIBLIOTECA

ESTUDO DE MUTAÇÕES NOS GENES
hMLH1 E *hMSH2* EM FAMÍLIAS BRASILEIRAS
COM SUSPEITA DE CÂNCER COLORRETAL
HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE

Benedito Mauro Rossi

Tese apresentada à Fundação Antonio
Prudente para obtenção do Grau de Doutor
em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Ademar Lopes

Co-Orientador: Dr. Andrew J. G. Simpson

São Paulo
2000



FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa
Hospital do Câncer A.C. Camargo

Rossi, Benedito Mauro

Estudo de mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2* em famílias brasileiras com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose / Benedito Mauro Rossi -- São Paulo, 2000.

p. 89

Tese (doutor)–Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Ademar Lopes.

Descritores: 1. CANCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE/diagnóstico/tratamento. 2. MUTAÇÃO GERMINATIVA. 3. GENES/*hMLH1*/*hMSH2*. 4. RASTREAMENTO GENÉTICO. 5. ANÁLISE SEQÜENCIAL, DNA.

Dedicatória

Dedico este trabalho à minha querida esposa Aglael, que com carinho, paciência e determinação me acompanha e estimula para o crescimento profissional, e aos meus pais, que sempre me apoiaram nos estudos.

Agradecimentos

Ao Dr. Ademar Lopes por sua orientação e competência. Pela honra do convívio profissional e do aprendizado em cirurgia oncológica nos últimos dezesseis anos. Pela honra do convívio pessoal e pela amizade fraterna sempre disponível, incansável e estimulante.

Ao Dr. Andrew J. G. Simpson por seu inestimável apoio desde o início deste trabalho, sempre demonstrando competência e disponibilidade na co-orientação e no laboratório.

Ao Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani, que por sua capacidade para a pesquisa abriu-me o novo horizonte da carreira acadêmica.

Ao Prof. Dr. Humberto Torloni por sua disponibilidade e amizade.

Ao Prof. Dr. Eugênio Bueno Ferreira por sua experiência e ajuda na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski, amigo e com capacidade de trabalho admirável, pela sua competência na qualificação deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sergio Nahas, por sua disponibilidade e apoio na qualificação deste trabalho.

Ao Dr. Fábio de Oliveira Ferreira e sua esposa Cláudia C. Napoli Ferreira pela amizade e apoio fundamentais na organização deste trabalho.

Ao Dr. José Cláudio Casali da Rocha por sua competência e suporte na elaboração deste trabalho.



À Dra. Catarina C. Simpson, aos biólogos, bioquímicos e técnicos do Laboratório de Biologia Molecular por sua disponibilidade e apoio.

Ao Dr. Wilson Toshihiko Nakagawa, sempre responsável e amigo para qualquer situação.

Ao Dr. Wilson Bachega Jr. por sua amizade e exemplo de trabalho competente.

À todos os colegas do Departamento de Cirurgia Pélvica por compartilharem sua experiência profissional, amizade e confiança.

À Sra. Suely Francisco e Sra. Rosineia Aguiar Carneiro pelo inestimável apoio na elaboração deste trabalho.

À Sra. Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari e à Srta. Márcia Miwa Hiratani pela sempre cordial atenção e apoio junto à Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente.

Aos biólogos, bioquímicos e técnicos do Laboratório de Genética de Câncer do Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer pelo suporte técnico.

Ao Centro de Tratamento e Pesquisa Hospital do Câncer, Fundação Antonio Prudente e a seus pacientes, pela minha formação profissional e pela oportunidade da realização deste trabalho.

À todos que de maneira direta ou indireta auxiliaram na elaboração deste trabalho.

RESUMO

Rossi BM. **Estudo de mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2* em famílias brasileiras com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose.** São Paulo; 2000. [Tese de Doutorado – Fundação Antonio Prudente].

O objetivo deste estudo é pesquisar mutações nos genes de reparo *hMLH1* e *hMSH2* através de seqüenciamento direto, em 25 pacientes de diferentes famílias brasileiras com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). Os casos foram consecutivamente incluídos no estudo de janeiro de 1995 a julho de 1999, e agrupados de acordo com os seguintes critérios: clássicos Critérios de Amsterdam I ou II para diagnóstico clínico de HNPCC; câncer colorretal (CCR) familiar, sem preenchimento dos Critérios de Amsterdam I ou II; idade precoce do diagnóstico de CCR, sem história familiar; idade precoce do diagnóstico de CCR com um ou dois parentes portadores de CCR ou câncer relacionado ao HNPCC (endométrio, vias excretoras renais, intestino delgado, estômago), sem preenchimento dos Critérios de Amsterdam I ou II; um caso apresentava CCR, múltiplos adenomas colorretais matacrônicos e tumor renal. Todos os casos foram estudados com extração de DNA de linfócitos de sangue periférico, amplificação com o uso da reação de polimerase em cadeia (PCR) e seqüenciamento direto dos genes de reparo

hMLH1 e *hMSH2*. Dez mutações foram detectadas nos 25 pacientes estudados (40% ou 10/25), sendo 7 novas. Dois pacientes de diferentes famílias apresentaram a mesma mutação. As características genéticas e clínicas das diferentes famílias foram analisadas. Entre as 10 mutações germinativas (9 diferentes) encontradas nos 25 casos, *hMLH1* teve maior índice de detecção que *hMSH2* (8/25 ou 32% vs. 2/25 ou 8%). Apenas 3 entre as 10 famílias com mutações detectadas preenchem os critérios clássicos de Amsterdam I ou II para diagnóstico de HNPCC (3/10 ou 30%). Nas outras 3 famílias com os Critérios de Amsterdam I não foram encontradas mutações nos genes de reparo *hMLH1* e *hMSH2*. A média de idade do diagnóstico de CCR no grupo com mutações detectadas foi de 45,7 anos e no grupo sem mutações detectadas de 46,5. Dois polimorfismos distintos foram detectados no gene *hMLH1*, um deles encontrado em 7 pacientes diferentes (7/25 ou 28%). Quatro polimorfismos distintos foram detectados no gene *hMSH2* em 4 pacientes diferentes, com índice de detecção de 1/25 para cada um. Em conclusão, o gene *hMLH1* teve um índice de detecção maior que o gene *hMSH2* nas famílias brasileiras analisadas. Além disso, 7 famílias com mutações detectadas não tinham o diagnóstico clínico estabelecido de HNPCC pelos Critérios de Amsterdam I ou II, assim sendo, o médico que trata pacientes com CCR precisa ter sempre em mente a possibilidade de hereditariedade, não apenas nos casos com preenchimento dos Critérios de Amsterdam I ou II, mas também quando houver diagnóstico de câncer em idade precoce,

ou história não típica de câncer familiar, incluindo o câncer gástrico e os tumores relacionados ao HNPCC.

SUMMARY

Rossi BM. **Estudo de mutações nos genes *hMLH1* e *hMSH2* em famílias brasileiras com suspeita de câncer colorretal hereditário sem polipose.** [*hMLH1* and *hMSH2* gene mutations in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer]. São Paulo (BR); 2000. [Tese de Doutorado – Fundação Antonio Prudente].

The aim of this study is to search for mutations in the *hMSH2* and *hMLH1* genes in 25 unrelated patients from Brazilian kindreds with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), by means of direct sequencing. Clinical and molecular findings will be compared. The cases were consecutively enrolled from January/1995 to July/1999, and grouped according to the following clinical criteria: former Amsterdam Criteria I or II; familial colorectal cancer (CRC); an early age of onset of CRC only; and an early age of onset of CRC with at least one or two relatives who have CRC or HNPCC related cancers; one case had multiple metachronous colon adenomas and renal cell carcinoma. All patients were studied with the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct sequencing of the *hMSH2* and *hMLH1* mismatch repair (MMR) genes. Ten mutations were detected out of 25 patients screened (detection rate: 40% or 10/25), of 9 different mutation, 7 were novel. Two unrelated cases presented the same mutation of the *hMLH1* gene. The genetic

characteristics of the CRC kindreds fulfilling the different criteria were analyzed: among the 10 germline mutations (9 different) found in the 25 cases, *hMLH1* had a higher mutation detection rate than *hMSH2* (8/25 or 32% vs. 2/25 or 8%), and only 3 of these families fulfilled the former Amsterdam criteria I or II (3/10 or 30%). In the other 3 families that fulfilled the Amsterdam I criteria, no mutations were detected in the *hMLH1* and *hMSH2* MMR genes. The mean age of the CRC diagnosis in the positive mutation group was 45.7 and in the group without detected mutations was 46.5. Two different polymorphisms were detected in *hMLH1* gene, one of them found in 7 different patients (7/25 or 28%). Four different polymorphisms were detected in the *hMSH2* gene in 4 different cases, with a detection rate of 1/25 each. The *hMLH1* gene had a higher mutation detection rate than *hMSH2* in the Brazilian kindreds analyzed. The physician who deals with CRC must take into consideration the heredity issue with patients who present an early age of onset of the disease, or familial history of CRC or HNPCC related cancers, including gastric cancer, even without fulfilling the former Amsterdam I or II criteria, used for HNPCC clinical characterization.

ÍNDICE

1.	Introdução	1
1.1	Incidência e objetivos	2
1.2	Histórico	4
1.3	Os genes, as proteínas e suas funções	6
1.4	Aspectos clínicos e diagnóstico	12
1.5	Diagnóstico diferencial e sobrevida	17
1.6	Indicação de testes genéticos e acompanhamento de famílias	19
1.7	Tratamento de pacientes com câncer e HNPCC	24
1.8	Suporte ao paciente e aconselhamento de risco	26
1.9	Referências Bibliográficas	28

2.	Trabalhos realizados	40
----	----------------------	----

2.1		41
-----	--	----

hMLH1 and hMSH2 gene mutations in Brazilian families with suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer.
submetido: Annals of Surgical Oncology – fevereiro / 2001.

2.2		71
-----	--	----

A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred.
publicado: Human Mutation, 13: 506-8, 1999.

2.3		75
-----	--	----

Tumores Colorretais Hereditários. Artigo de Revisão.
publicado: Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões
25: 271-80, 1998.

3.	Conclusões	86
----	------------	----

1. INTRODUÇÃO

1.1 Incidência e objetivos

O câncer colorretal (CCR) é o sexto em incidência no Brasil. Se considerarmos apenas a região Sudeste, é o segundo mais freqüente no homem, atrás do câncer de próstata, e o terceiro na mulher, atrás do câncer de mama e do colo de útero. Se não considerarmos o sexo, o CCR é o segundo mais incidente na região Sudeste, atrás apenas do câncer de mama, com estimativa de 9.400 casos novos por ano (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE 1999). Nos Estados Unidos a estimativa é de 130.200 novos casos anuais de CCR (GREENLEE ET AL. 2000).

Não existem dados sobre a incidência de câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) no Brasil. Porém, se considerarmos a literatura internacional, esse número está entre 3% e 12% de todos os casos de CCR (LYNCH e SMYRK 1996; ROSSI e PINHO 1999). Assim, se usarmos um valor médio de 8%, teremos cerca de 752 novos casos de CCR por ano no Brasil pertencentes à famílias de HNPCC. Nos Estados Unidos esse número chega a 10.416. Portanto, trata-se de um problema real e que precisa ser estudado, principalmente quando se considera uma população como a brasileira e suas características genéticas peculiares, com influências africanas, indígenas e européias.

O objetivo deste estudo é avaliar os principais genes responsáveis pelo HNPCC, *hMLH1* e *hMSH2*, e suas principais mutações em famílias brasileiras. Devido à ausência de publicações relativas ao assunto no

Brasil, este trabalho tem também o objetivo de estimular o estudo do HNPCC em nosso meio e divulgar as características clínicas e genéticas da doença entre todos que lidam com CCR. Somente desta maneira, o diagnóstico correto será realizado, possibilitando, por conseguinte, melhor planejamento terapêutico para os pacientes e orientação correta para suas famílias.

1.2 Histórico

O conhecimento das bases genéticas do HNPCC teve um desenvolvimento muito grande nos últimos 10 anos. Hoje sabemos que é uma doença hereditária autossômica dominante, causada por mutação germinativa, em um dos genes responsáveis pelo reparo do DNA, durante a divisão celular. Se uma segunda mutação somática ocorrer no alelo normal correspondente ao defeito herdado, a célula afetada poderá acumular novas mutações rapidamente, aumentando a chance de aparecimento de câncer (LYNCH e SMYRK 1996).

Alfred Warthin, em 1895, observou uma família que chamou de “G”, onde havia uma alta incidência de câncer gástrico, de endométrio e colorretal (WARTHIN 1913). Ele estava diante de uma família hoje clinicamente caracterizada como HNPCC. Porém, somente na década de 1960, com a descrição de duas grandes famílias caracterizadas como portadoras de “Síndrome do Câncer Familiar”, é que se valorizou a descrição de Warthin, feita quase 70 anos antes (LYNCH et al. 1966). Vários relatos de famílias com características semelhantes foram então feitos na literatura internacional. Porém, foi um grupo finlandês, com seu registro de CCR muito bem organizado, que demonstrou que a síndrome, agora chamada internacionalmente de HNPCC, por alguns autores chamada de Síndrome de Lynch, não era rara em seu país (MECKLIN 1987). Esse fato demonstra a importância da organização do registro e da

coleta de dados referentes a pacientes com câncer. Hoje, vários grupos colaborativos e instituições em todo o mundo dedicam-se ao estudo do HNPCC.

1.3 Os genes, as proteínas e suas funções

O HNPCC é causado pela ocorrência de uma mutação germinativa transmitida de forma autossômica dominante em um dos genes de reparo do DNA: *hMSH2* (human mutS homolog 2), no cromossomo 2p16 (FISHEL et al. 1993; LEACH et al. 1993); *hMLH1* (human mutL homolog 1), no 3p21 (BRONNER et al. 1994; PAPADOPOULOS et al. 1994); *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1), no 2q31-33 (NICOLAIDES et al. 1994); *hPMS2* (human postmeiotic segregation 2), no 7p22 (NICOLAIDES et al. 1994); *hMSH6/GTBP* (human mutS homolog 6), no 2p16, há 0.5 megabase do *hMSH2* (DRUMMOND et al. 1994; PALOMBO et al. 1995). Mais recentemente, relatos de novos genes de reparo envolvidos têm sido descritos, como o *hMLH3* e o *hMSH3* (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000; LIPKIN et al. 2000).

Os genes de reparo agem como controladores de qualidade, mantendo a fidelidade do DNA na divisão celular, por meio de mecanismos que identificam, retiram e corrigem os erros nas seqüências de bases. Esses erros podem ocorrer por pareamento errado entre as bases ou por falha da enzima DNA polimerase, causando alças de inserção/deleção de bases (IDLs). As IDLs ocorrem por deslizamento errôneo da enzima na fita molde de DNA, geralmente em de seqüências de bases repetitivas, como, por exemplo, os microssatélites. Por isso, cerca de 90% dos pacientes com CCR em famílias de HNPCC apresentam instabilidade de microssatélites

(MSI), ou seja, alterações genéticas nessas seqüências repetitivas, em seus tumores (AALTONEN et al. 1993; PELTOMAKI et al. 1993; STRAND et al. 1993).

Dois grupos principais de proteínas estão envolvidos no processo de reparo em humanos: mutSh e mutLh. O modelo postulado para a correção dos erros consiste de três passos básicos: reconhecimento do erro e formação do *reparossomo*, degradação da fita de DNA contendo o erro, e finalmente, realização do reparo. Um primeiro heterodímero chamado de hMutS α , formado por proteínas do grupo de homólogos de mutS (MSH), hMSH2 e hMSH6, tem sua ação principalmente nos erros de pareamento entre as bases. Um segundo heterodímero chamado de hMutS β , formado por hMSH2 e hMSH3, também pode iniciar o processo; porém, com ação principalmente nas IDLs. Por isso, os mecanismos de ação desses dois heterodímeros são complementares (JIRICNY 1998). O passo seguinte nesse processo é desempenhado pela atividade da enzima *ATPase*, codificada na metade carboxi-terminal dos homólogos *mutS* (FISHEL e WILSON 1997). O ganho de um fosfato (ADP > ATP) no heterodímero hMutS α causa uma mudança conformacional no mesmo, transformando-o em uma espécie de braçadeira que corre sobre a dupla fita de DNA a ser reparada ("*sliding clamp*") desempenhando assim sua função (BLACKWELL et al. 1998; GRADIA et al. 1999; IACCARINO et al. 2000). A proteína hMSH6 parece ter papel fundamental nessa fase, que ainda não é bem conhecida. Outras proteínas parecem também ser parte do processo nessa

fase, como as provenientes dos homólogos mutL (MLH) e dos PMS (*postmeiotic segregation*), além dos antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA) RPA e RFC, e das exo/endonucleases EXO1 e FEN1 (JIRICNY 1998; KOLODNER e MARSISCHKY 1999). Outro heterodímero chamado hMutL α , formado pelas proteínas hMLH1 e hPMS2, também parece estar envolvido com o mecanismo de reparo, assim como o hMutL β (proteínas hMLH1 e hPMS1); porém, ainda com mecanismos de ação pouco esclarecidos em humanos (RÄSCHLE et al. 1999; LIPKIN et al. 2000). Caso os mecanismos de reparo não sejam suficientes para corrigir os erros de replicação do DNA, a maquinaria de apoptose é ativada, levando a célula à morte (FISHEL 1999).

A perda do mecanismo de reparo em indivíduos com uma mutação germinativa herdada, ou seja, com um alelo defeituoso, ocorre quando o alelo normal ou selvagem também perde sua função por perda de heterozigose (LOH) (PAPADOPOULOS et al. 1994; PARSONS et al. 1995). Processo semelhante ocorre com os genes supressores de tumor. Células sem o mecanismo de reparo funcionando têm uma probabilidade cerca de 1000 vezes maior de acumular mutações, acelerando, conseqüentemente, o processo de múltiplos passos da carcinogênese (BHATTACHARYYA et al. 1994; SHIBATA et al. 1994).

Muitas vezes é difícil diferenciar uma mutação com potencial patogênico de um polimorfismo, ou seja, uma variação individual sem efeito fenotípico deletério. Para melhor entendermos essa diferenciação,

alguns conceitos devem ser explicitados. Quando a mutação no DNA é do tipo “*frameshift*”, ou seja, existe uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na fita de DNA, existe uma mudança da fase de leitura dos códons localizados após a alteração, causando mudança dos aminoácidos na tradução do RNA mensageiro, e geralmente uma parada, codificada por códon específico, com produção de uma proteína menor que o tamanho original, chamada de proteína truncada. No caso da simples troca de um nucleotídeo, podemos ter duas possibilidades. A primeira é que essa troca resulte em um códon específico para a parada da tradução do RNA mensageiro, causando também uma proteína truncada, de tamanho menor. Essa mutação é chamada de “*nonsense*”. A segunda possibilidade é de que a simples troca de um nucleotídeo cause apenas a mudança de um aminoácido por outro, não alterando o restante da codificação da proteína e formando conseqüentemente uma proteína de tamanho normal. Essa mutação é chamada de “*missense*” (CAMARGO et al. 1999).

Quando detectamos uma mutação tipo “*frameshift*” ou “*nonsense*” nos genes de reparo em uma família com HNPCC, a chance de elas serem patogênicas, causadoras de alterações fenotípicas predisponentes ao câncer, é muito grande, pois a proteína codificada é truncada e muito alterada. Já no caso das mutações “*missense*”, a proteína tem o tamanho normal, com a troca de um único aminoácido, podendo não haver alteração de sua função. Por isso, nessa situação, pode ser difícil diferenciar entre uma mutação patogênica e um polimorfismo.

Nesses casos, o mais indicado é correlacionar portadores da alteração “*missense*” detectada com o diagnóstico de câncer dentro da família em questão. Assim, saberemos se existe ou não o potencial patogênico da mutação em estudo.

Outra possibilidade de diferenciação é realizar testes de biologia molecular em laboratório. Entre esses testes, temos o que se baseia na superexpressão da proteína humana no reparo de DNA em leveduras normais. Proteínas humanas normais e variantes não patogênicas interferem com o sistema de reparo da levedura, causando um fenótipo alterado, enquanto mutações patogênicas humanas não interferem com o sistema de reparo (SHIMODAIRA et al. 1998; CLARK et al. 1999).

Outro teste também usa a levedura, mas, nesse caso, os genes humanos em estudo são introduzidos nas respectivas posições do *S. cerevisiae* e verifica-se o fenótipo produzido. A limitação desse método é que apenas genes conservados entre a levedura e o homem podem ser testados (DROTSCHMANN et al. 1999; SHCHERBAKOVA e KUNKEL 1999).

Um terceiro teste analisa o heterodímero hMutL α expresso em vírus, confirmando mutação em hMLH1 quando há alteração da interação com hPMS2. Algumas mutações em hMLH1 também podem alterar sua interação com o heterodímero hMutS α , o que causa um sistema de reparo não funcionante *in vitro* (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000).

Um último teste estuda proteínas hMSH2 e hMLH1 traduzidas *in vitro* e suas interações. Mutações em hMSH2 não alteram sua interação

com hMSH6 e hMSH3, sugerindo que outras funções, como a atividade da enzima *ATPase*, foram alteradas. Mutações amino-terminais em hMLH1 têm comportamento semelhante, mas mutações carboxi-terminais causam perda de interação com hPMS2 (GUERRETE et al. 1998; GUERRETE et al. 1999).

1.4 Aspectos clínicos e diagnóstico

O diagnóstico do HNPCC é clínico. Por isso, os médicos que lidam com pacientes portadores de CCR e tumores relacionados ao HNPCC devem conhecer as características clínicas da doença.

As principais características do HNPCC são (BAYLEY-WILSON et al. 1986; LYNCH e SMYRK 1996):

- >Diagnóstico de câncer em idade precoce, em torno dos 47 anos de idade;
- >CCR com predominância pelo lado direito do cólon, em torno de 70% dos casos;
- >Associação com CCR metacrônico, em torno de 45% em 10 anos, se houver cólon remanescente após a primeira cirurgia;
- >Associação com tumores extracolônicos, incluindo adenocarcinoma de endométrio, intestino delgado, estômago e ovário, e, carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais.

Além das características clínicas descritas, alguns achados anatomopatológicos do CCR em HNPCC são comuns, tais como: células em anel de sinete, componente mucinoso e predomínio de lesões indiferenciadas.

Em 1991, com a intenção de padronização internacional do diagnóstico clínico de HNPCC, o Grupo Colaborativo Internacional (ICG/HNPCC) publicou os chamados Critérios de Amsterdam (VASEN et al. 1991), que consistem dos seguintes tópicos:

- >Pelo menos 3 membros de uma mesma família com CCR;
- >Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- >Pelo menos 2 gerações acometidas;
- >Pelo menos 1 dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- >Exclusão de polipose adenomatosa familiar.

Os Critérios de Amsterdam tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico de HNPCC.

Porém, também foram criticados pela exclusão dos tumores extracolônicos. Por isso, em 1999, o mesmo ICG/HNPCC publicou novos critérios para o diagnóstico clínico do HNPCC (VASEN et al. 1999), acrescentando aos critérios de 1991, a possibilidade dos seguintes tumores, além do CCR:

- >Adenocarcinoma de endométrio;
- >Adenocarcinoma de intestino delgado;
- >Carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais.

Tumores de estômago e ovário não foram incluídos, segundo os autores, por sua baixa incidência dentro da síndrome. É interessante notar que não há menção sobre a necessidade do diagnóstico de CCR dentro de uma família para o diagnóstico do HNPCC, bastando o preenchimento dos Critérios de Amsterdam com tumores extracolônicos.

Claro que o espectro de diagnóstico do HNPCC foi ampliado com os novos Critérios de Amsterdam; porém, ainda existem algumas críticas, sendo a principal delas relativa à dificuldade de diagnóstico clínico

principalmente em famílias pequenas, com poucos descendentes, fato comum na Europa, por exemplo. Nesses casos, para o diagnóstico clínico ser realizado, teríamos que esperar muito tempo, retardando portanto a orientação e o acompanhamento familiar.

Dentro desse enfoque, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) já havia publicado em 1997 os Critérios de Bethesda (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997), não com o intuito de caracterizar o diagnóstico clínico de HNPCC, mas sim de indicar a pesquisa molecular da síndrome, por meio de MSI, em pacientes com suspeita de pertencerem à famílias de HNPCC. A pesquisa de MSI serve como um teste de rastreamento, para posterior seqüenciamento dos principais genes de reparo (MMR) nas famílias onde estiver presente, pois a instabilidade, como já vimos, ocorre na grande maioria dos casos de HNPCC. Os Critérios de Bethesda, para indicação de pesquisa de MSI, apoiam-se basicamente nos seguintes pontos, além dos Critérios de Amsterdam:

- >Pacientes portadores de CCR e com 1 tumor extracolônico relacionado ao HNPCC, e idade menor que 45 anos, ou com adenomas colorretais, e idade menor que 40 anos;
- >Pacientes com CCR e idade menor que 45 anos, com atenção para os tumores indiferenciados ou com células em anel de sinete;
- >Pacientes com adenocarcinoma de endométrio e idade menor que 45 anos;
- >Pacientes com adenomas colorretais, antes dos 40 anos de idade.

Diante das possibilidades criadas pelos Critérios de Bethesda, mais uma vez fica reforçada a proposta da disseminação desses conhecimentos entre todos os médicos que tratam pacientes com CCR ou tumores extracolônicos relacionados ao HNPCC, uma vez que a suspeita clínica de estarmos diante de um paciente pertencente à uma família com HNPCC vem de uma história familiar bem feita e detalhada, e das características da síndrome, mesmo sem o preenchimento dos Critérios de Amsterdam.

Apesar de os pacientes com HNPCC não apresentarem um quadro típico de múltiplos pólipos adenomatosos no cólon precedendo o aparecimento do câncer, como na polipose adenomatosa familiar, essas lesões representam a principal causa precursora do CCR nessas famílias. Existem descrições na literatura de pacientes que apresentaram evolução rápida e agressiva para CCR, a partir de pólipos adenomatosos (JASS e STEWART 1992; LANSPA et al. 1994). Um estudo realizado na Finlândia comparou a incidência de CCR e as taxas de óbito, estudando 2 grupos de pacientes com HNPCC, o primeiro submetido a colonoscopias regularmente, e o segundo formado por pacientes que se recusavam a realizar o exame. Ficou demonstrado que 1 CCR foi prevenido para cada 2,8 pólipos ressecados em pacientes com HNPCC (SANKILA et al. 1996). Na população em geral, 1 CCR é prevenido para cada 41 a 119 polipectomias realizadas (WINAWER et al. 1993).

A Síndrome de Muir-Torre, descrita em meados da década de 1960 (MUIR et al. 1966; TORRE 1968), é caracterizada pela associação de lesões

cutâneas à tumores relacionados hoje ao HNPCC. Essas lesões cutâneas são geralmente adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos ou queratoacantomas. Hoje, sabemos que essas lesões, apesar de raras, podem fazer parte do HNPCC, sendo causadas também por falha dos genes de reparo (HALL et al. 1994).

1.5 Diagnóstico diferencial e sobrevida

Uma das maiores dificuldades no diagnóstico dos pacientes com CCR e HNPCC é a diferenciação com os casos esporádicos de CCR. Às vezes, é muito difícil estabelecermos a correlação com a hereditariedade, mesmo usando todos os critérios já expostos. Além disso, existe a possibilidade, ainda não bem estabelecida quantitativamente na literatura, de estarmos diante de um caso com uma mutação “*de novo*”, ou seja, a primeira mutação germinativa dentro de uma família.

Outro diagnóstico, que as vezes pode dificultar a diferenciação com o HNPCC, é o da polipose adenomatosa familiar atenuada (AFAP). Nesses casos, podem ocorrer poucos pólipos no cólon, e, além disso, o tipo de herança é o mesmo: autossômica dominante. Nessas situações, os testes genéticos podem redimir a dúvida. O seqüenciamento pode evidenciar mutações no início do gene *APC*, característica da AFAP (SPIRIO et al. 1993; LYNCH et al. 1995).

Com relação à melhor sobrevida de pacientes com tumores correlacionados ao HNPCC, não existe uma explicação plausível na literatura. Talvez seja conseqüência da baixa incidência de metástases em pacientes com a síndrome (JASS et al. 1994) ou do acompanhamento mais rigoroso desses indivíduos, pelo conhecido risco elevado de aparecimento de câncer. Porém, a causa desses achados ainda é desconhecida. Apesar disso, vários autores demonstraram o fato, como por exemplo, o mesmo

estudo já citado anteriormente, que concluiu que pacientes portadores de CCR e HNPCC têm sobrevida de 65% em 5 anos, contra 44% para aqueles com CCR esporádico (SANKILA et al. 1996).

1.6 Indicação de testes genéticos, orientação e acompanhamento de famílias com HNPCC

A indicação de testes moleculares deve seguir padrões bem definidos e objetivos. O estabelecimento dessas indicações facilita o diagnóstico, diminui a ansiedade do paciente, da família e da equipe multiprofissional.

Podemos dividir os pacientes com CCR em três grupos, no que concerne à hereditariedade, portadores de:

- > Tumores esporádicos, ou seja, sem características suspeitas de hereditariedade;
- > Tumores hereditários, ou seja, aqueles que preenchem os Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico;
- > Tumores com suspeita de hereditariedade, seguindo os Critérios de Bethesda.

Pacientes com CCR esporádico devem ter o acompanhamento pós-operatório já bem estabelecido, sem a preocupação com os exames nos membros da família, mas, em cada retorno, o médico deve sempre questionar sobre novas informações referentes aos antecedentes familiares.

Pacientes com diagnóstico suspeito de hereditariedade, segundo os Critérios de Bethesda, têm indicação de pesquisa de MSI em tecido tumoral como primeira opção. Existem algumas controvérsias na literatura, mas parece que não é necessária a realização de um painel de

diferentes microssatélites para o diagnóstico de instabilidade. Trabalhos recentes demonstram uma acurácia muito boa de diagnóstico feita apenas com a realização da pesquisa de instabilidade de um único microssatélite, chamado BAT26 (DE LA CHAPELLE 1999), exame realizado de rotina no Hospital do Câncer A.C. Camargo. No caso da instabilidade mostrar-se presente, está indicada a realização do seqüenciamento dos genes de reparo *hMLH1* e *hMSH2*, responsáveis até por 60% e 35%, respectivamente, das causas de HNPCC (PELTOMAKI e VASEN 1997; JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). KOLODNER et al. (1999) e WIJNEN et al. (1999), analisando 58 e 278 famílias com HNPCC, referem que os dois genes somados, *hMLH1* ou *hMSH2*, são causadores da doença entre 40% e 55% das vezes. Esses números têm uma variabilidade na literatura, mas aceita-se internacionalmente esses dois genes como os principais causadores da doença.

Como vimos anteriormente, existe uma ação conjunta entre os genes de reparo para a execução de sua função, e como *hMLH1* e *hMSH2* participam dos principais heterodímeros no processo, suas inativações resultam em falha do reparo base/base e das IDLs. Se o resultado do seqüenciamento desses dois genes for normal em uma família com suspeita clínica de HNPCC, indicamos o seqüenciamento do gene *hMSH6*. Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre essa indicação, o número de famílias com mutações detectadas em *hMSH6* tem aumentado substancialmente (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). Até o momento,

entre 1% a 3% das famílias com HNPCC apresentam mutações em *hMSH6* (KOLODNER et al. 1999). Os demais genes de reparo, *hPMS1* e *hPMS2*, são esporadicamente descritos como mutados e causadores de HNPCC (PAPADOPOULOS et al. 1994).

Pacientes com preenchimento dos Critérios de Amsterdam para diagnóstico clínico de HNPCC devem ter indicação de seqüenciamento dos genes *hMLH1* e *hMSH2*. Se estes forem normais, também devem ter a indicação do seqüenciamento de *hMSH6*.

O primeiro teste dentro de uma família com diagnóstico clínico de HNPCC deve ser realizado em um indivíduo com tumor (probando), de preferência o mais jovem da família. Esse procedimento deve ser realizado porque, se a família tem o diagnóstico clínico de HNPCC e aquele membro é portador de câncer, é nele que temos a maior probabilidade de detecção da mutação, ou seja, se a mutação for detectável, será nesse indivíduo (LYNCH e SMYRK 1996). Seguindo ainda nesse exemplo, se a mutação for detectada nesse indivíduo, teremos um resultado positivo do teste genético, com uma família clínica e molecularmente caracterizada como HNPCC. Nessa situação, poderemos pesquisar a mesma mutação, característica dessa família, nos demais membros, e diagnosticar quais os indivíduos assintomáticos, mas portadores da predisposição ao câncer. Com isso, a indicação da realização dos exames de seguimento fica restrita aos portadores da predisposição. Como a penetrância dos genes defeituosos de reparo está em torno de 80%, essa é a probabilidade do

genótipo transformar-se em fenótipo tumoral nos indivíduos portadores (VASEN et al. 1996). Membros com teste negativo, ou seja, sem a predisposição detectada na família, ficam liberados do seguimento; porém, recomendamos uma colonoscopia a cada 5 anos para esses indivíduos, principalmente após os 50 anos.

Se imaginarmos essa mesma família citada como exemplo, mas sem a detecção da mutação nos genes de reparo no probando (primeiro membro com câncer testado na família), o teste genético nesse caso, é chamado de inconclusivo, pois não terá utilidade para rastrear os membros portadores da predisposição e assintomáticos. Nessa situação, a família continua sendo caracterizada clinicamente como HNPCC, mas com teste genético inconclusivo, ou seja, todos os membros passam a ser suspeitos de possuir a predisposição ao câncer, e, conseqüentemente, devem fazer o seguimento. O que acontece nessas situações é que ainda não temos conhecimento suficiente sobre todos os genes de reparo e suas funções para indicarmos exames moleculares mais específicos.

O seguimento dos indivíduos portadores da mutação de predisposição ao câncer, de famílias com teste genético inconclusivo, e de famílias sem condições de realização do teste genético deve ser realizado com base nas seguintes orientações (LYNCH e SMYRK 1996):

- >Colonoscopia com 1-3 anos de intervalo, com início entre os 20-25 anos;
- >Ultrassonografia transvaginal anual, com início entre os 25-35 anos;

- >Ultrassonografia abdominal e pélvica anual, com início entre os 25-35 anos;
- >Exame de urina tipo I e citologia urinária anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais;
- >Endoscopia digestiva alta com 1-3 anos de intervalo, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com tumores gástricos;
- >Dosagem de CA-125 anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com câncer de ovário.

1.7 Tratamento de indivíduos com câncer e HNPCC

O ponto mais importante no tratamento de pacientes com CCR e HNPCC é a conduta diferenciada com relação a pacientes com CCR esporádico. Pacientes com câncer de cólon e HNPCC devem ser submetidos à colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Essa conduta é indicada devido à alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. Esses indivíduos devem fazer retoscopias regularmente, com 1-3 anos de intervalo. Pacientes com câncer de reto e HNPCC devem ser submetidos à proctocolectomia total, se possível com preservação esfinteriana, utilizando-se bolsa ileal e anastomose anal na reconstrução. No caso de comprometimento esfinteriano pelo tumor, deve-se realizar a amputação abdômino-perineal do reto e ânus juntamente com a colectomia total, e uma ileostomia definitiva, que pode ser continente.

Em casos de tumores extracolônicos, a cirurgia deve obedecer os padrões clássicos da cirurgia oncológica para o órgão acometido.

Existe controvérsia sobre a cirurgia profilática, ou seja, remover cirurgicamente um órgão normal de um indivíduo assintomático, sabidamente portador da predisposição genética ao câncer (com teste positivo). Em nosso ponto de vista, essa não deve ser uma cirurgia com indicação rotineira, mas deve ser oferecida como possibilidade aos indivíduos assintomáticos com teste genético positivo (RODRIGUES-BIGAS

1.7 Tratamento de indivíduos com câncer e HNPCC

O ponto mais importante no tratamento de pacientes com CCR e HNPCC é a conduta diferenciada com relação a pacientes com CCR esporádico. Pacientes com câncer de cólon e HNPCC devem ser submetidos à colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Essa conduta é indicada devido à alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. Esses indivíduos devem fazer retoscopias regularmente, com 1-3 anos de intervalo. Pacientes com câncer de reto e HNPCC devem ser submetidos à proctocolectomia total, se possível com preservação esfínteriana, utilizando-se bolsa ileal e anastomose anal na reconstrução. No caso de comprometimento esfínteriano pelo tumor, deve-se realizar a amputação abdômino-perineal do reto e ânus juntamente com a colectomia total, e uma ileostomia definitiva, que pode ser continente.

Em casos de tumores extracolônicos, a cirurgia deve obedecer os padrões clássicos da cirurgia oncológica para o órgão acometido.

Existe controvérsia sobre a cirurgia profilática, ou seja, remover cirurgicamente um órgão normal de um indivíduo assintomático, sabidamente portador da predisposição genética ao câncer (com teste positivo). Em nosso ponto de vista, essa não deve ser uma cirurgia com indicação rotineira, mas deve ser oferecida como possibilidade aos indivíduos assintomáticos com teste genético positivo (RODRIGUES-BIGAS

1996). Deve-se colocar a probabilidade de desenvolvimento de câncer, principalmente relacionada à penetrância do gene mutado, explicar sobre a possibilidade de outros órgãos alvo para o câncer e detalhar sobre as complicações possíveis da cirurgia indicada. Feito isso, a decisão deve ser tomada conjuntamente por paciente e médico. As duas cirurgias profiláticas que podem ser indicadas atualmente são (LYNCH e SMYRK 1996):

>Colectomia total com anastomose ileorretal;

>Histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral em mulheres pós-menopausadas ou após a idade reprodutiva.

1.8 Suporte ao paciente e aconselhamento de risco

Os testes genéticos são apenas uma parte do processo que inclui diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes e famílias suspeitas de HNPCC. No Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C.Camargo existe uma rotina de atendimento a esses pacientes. Após a suspeita clínica de CCR hereditário, o paciente é encaminhado para a realização de uma consulta com a finalidade de levantar detalhadamente sua história familiar de câncer. Antes da consulta o paciente é encorajado a trazer outros membros de sua família consigo, de preferência pessoas mais idosas, que tenham conhecimento sobre parentes mais velhos ou distantes, muitas vezes já falecidos. É orientado também a trazer o maior número possível de informações sobre cada membro de sua família, como por exemplo:

- >Nome;
- >Data de nascimento e de morte;
- >Causa da morte;
- >Doenças associadas;
- >Cirurgias realizadas.

Uma vez que nessa primeira consulta é realizada a construção do heredograma, juntamente com preenchimento de uma ficha de dados de cada membro da família, e registro em banco de dados Institucional. Caso se confirme a suspeita clínica de HNPCC, segundo os critérios já expostos,

é realizada a indicação de teste genético (MSI ou seqüenciamento dos genes de reparo) para o probando, sempre com consentimento informado escrito e assinado. Após o conhecimento do resultado do teste, este é entregue em mãos ao paciente, com total confidencialidade. Inicia-se então o processo de orientação familiar, o qual pode ou não incluir a indicação de testes genéticos para os demais membros da família, com acompanhamento clínico e suporte psicológico. As famílias são classificadas como HNPCC, seguindo os Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico, ou suspeitas, pelos Critérios de Bethesda. Esquema de atendimento semelhante foi proposto por Lynch (LYNCH et al. 1999) e também por outros autores (THOMPSON et al. 1995; BURKE et al. 1997).

1.9 Referências Bibliográficas

Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. **Science** 1993; 260: 812-6.

Bayley-Wilson JE, Elston RC, Schuelke GS, Kimberling W, Albano W, Lynch JF, Lynch HT. Segregation analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Genet Epidemiol** 1986; 3: 27-38.

Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. **Proc Natl Acad Sci USA** 1994; 91: 6319-23.

Blackwell LJ, Martik D, Bjornson KP, Bjornson ES, Modrich P. Nucleotide-promoted release of hMutS α from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. **J Biol Chem** 1998; 273: 32055-62.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordensjold M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature** 1994; 368: 258-261.

Burke W, Petersen G, Lynch P, Botkin J, Daly M, Garber J, Kahn MJE, Tiernan AM, Offit K, Thomson E, Varrichio C. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. **JAMA** 1997; 277: 915-9.

Camargo AA, Dias Neto E, Simpson AJG. Mutação e câncer. In: Rossi BM, Pinho M, editors. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar; 1999. p.111-23.

Clark AB, Cook ME, Tran HT, Gordenin DA, Resnick MA, Kunkel TA. Functional analysis of human MutS α and MutS β complexes in yeast. **Nucleic Acids Res** 1999; 27: 736-42.

De La Chapelle A. Testing tumors for microsatellite instability. **Eur J Hum Genet** 1999; 7: 407-8.

Drotschmann K, Clark AB, Kunkel TA. Mutator phenotypes of common polymorphisms and missense mutations in *MSH2*. **Curr Biol** 1999; 9: 907-10.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an *hMSH2*-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 1994; 268:1909-12.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999**. Rio de Janeiro: INCA; 1999.

Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. **Nature Med** 1999; 5: 1239-41.

Fishel R, Wilson T. MutS homologs in mammalian cells. **Curr Opin Genet Dev** 1997; 7: 105-13.

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 1993; 75: 1027-38.

FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE

ANA MARIA R. A. KUNINARI
Coordenadora de Pós-Graduação

Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, Fishel R. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. **Mol Cell** 1999; 3: 255-61.

Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. **CA Cancer J Clin** 2000; 50: 7-33.

Guerrete S, Wilson T, Gradia S, Fishel R. Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Mol Cell Biol** 1998; 18: 6616-23.

Guerrete S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **J Biol Chem** 1999; 274: 6336-41.

Hall NR, Murday VA, Chapman P, Willians MAT, Burn J, Finan PJ, Bishop DT. Genetic linkage in Muir-Torre syndrome to the same chromosomal region as cancer family syndrome. **Eur J Cancer** 1994; 30A: 180-2.

Iaccarino I, Marra G, Dufner P, Jiricny J. Mutation of the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutS α sliding clamp from translocating along DNA. **J Biol Chem** 2000; 275: 2080-6.

Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 1992; 33: 783-6.

Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Anticancer Res** 1994; 14: 1631-4.

Jiricny J. Replication errors: cha(lle)nging the genome. **EMBO J** 1998; 17: 6427-36.

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

Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. **Curr Opin Genet Dev** 1999; 9: 89-96.

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP. Germline MSH6 mutations in colorectal cancer families. **Cancer Res** 1999; 59: 5068-74

Lanspa SJ, Jenkins JX, Cavalieri J, Smyrk TC, Watson P, Lynch J, Lynch HT. Surveillance in Lynch syndrome: how aggressive? **Am J Gastroenterol** 1994; 89: 1978-80.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Guan XY, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Cerosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Jarvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, De La Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell** 1993; 75: 1215-25.

Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Base S, Baxevanis A, Lynch HT, Elliot R, Collins FS. *MLH3*: a novel DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. **Nat Genet** 2000; 24: 27-35.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch syndrome). An update review. **Cancer** 1996; 78: 1149-67.

Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. **Arch Intern Med** 1966; 117: 206-12.

Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, Lanspa S, Cavalieri J, Lynch J, Slominski-Castor S, Cayouette MC, Priluck I, Luce MC. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. **Cancer** 1995; 76: 2427-33.

Lynch HT, Watson P, Shaw TG, Lynch JF, Harty AE, Franklin BA, Kapler CR, Tinley ST, Liu B. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer (Part I: studies of cancer families). **Cancer** 1999; 86: 1629-36.

Mecklin JP. Frequency of hereditary colorectal carcinoma.

Gastroenterology 1987; 93: 1021-5.

Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, larynx associated with keratoacanthomata of the face. **Br J Surg** 1966; 54: 191-5.

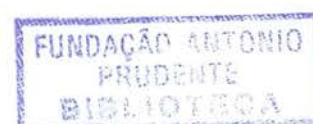
Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlop MG, Hamilton SR, Petersen GM, De La Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutations of two *PMS* homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. **Nature** 1994; 371: 75-80.

Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J. *GTBP*, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 1995; 268: 1912-14

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Hamilton SR, Petersen GM, Watson P, Lynch HT, Peltomaki P, Mecklin JP, De La Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. **Science** 1994; 263: 1625-9.

Parsons R, Li G, Longley M, Modrich P, Lui B, Berk T, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. **Science** 1995; 268: 738-40.

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



Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkanen L, Nystrom-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, Brogger A, Borresen A, De La Chapelle A. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. **Cancer Res** 1993; 53: 5853-5.

Räschle M, Marra G, Nyström-Lahti M, Schär P, Jiricny J. Identification of hMutL β , a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. **J Biol Chem** 1999; 274: 32368-75.

Rodrigues-Bigas MA. Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer** 1996; 78: 199-201.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89: 1758-62.

Rossi BM, Pinho M. Tumores colorretais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M, editors. **Genética e biologia molecular para o cirurgião**. São Paulo: Lemar; 1999. p.173-200.

Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin J. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer.

Gastroenterology 1996; 110: 682-7.

Shcherbakova PV, Kunkel TA. Mutator phenotypes conferred by MLH1 overexpression and by heterozygosity for *mlh1* mutations. **Mol Cell Biol** 1999; 19: 3177-83.

Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal carcinoma cell lines. **Nat Genet** 1994; 6: 273-81.

Shimodaira H, Filosi N, Shibata H, Suzuki T, Radice P, Kanamaru R, Friend SH, Kolodner RD, Ishioka C. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat Genet** 1998; 19: 384-9.

Spirio L, Olschwang S, Groden J, Robertson M, Samowitz W, Joslyn G, Gelbert L, Thliveris A, Carlson M, Otterud B, Lynch HT, Watson P, Lynch P, Laurent-Puig P, Burt R, Hughes JP, Thomas G, Leppert M, White R. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. **Cell** 1993; 75: 951-7.

Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. **Nature** 1993; 365: 274-6.

Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, Vachon C, Ahrens M, Potter JD, Sumpmann M. Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancers Centers. **J Natl Cancer Inst** 1995; 87: 1446-55.

Torre D. Multiple sebaceous tumors. **Arch Dermatol** 1968; 98: 549-51.

Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). **Dis Colon Rectum** 1991; 34: 424-5.

Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, Kleibeuer JH, Taal BG, Griffioen G, Nagengast FM, Meijers-Heijboer EH, Bertario L, Varesco L, Bisgaard ML, Mohr J, Fodde R, Khan PM. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. **Gastroenterology** 1996; 110: 1020-7.

Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC.

Gastroenterology 1999; 116: 1453-6.

Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma. **Arch Intern Med** 1913; 12: 546-55.

Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, Van Der Klift H, Moller P, Stormorken A, MeijersHeijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Moslein G, Tops C, Brocker-Vriends A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. **Nat Genet** 1999; 23; 142-4.

Winawer S, Zauber AG, O'Brien MJ, Ho MN, Gottlieb L, Sternberg SS, Waye JD, Bond J, Schapiro M, Stewart ET, Panish J, Ackroyd F, Kurtz RC, Shike M, National Polyp Study Workgroup. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. **N Engl J Med** 1993; 328: 901-6.

2. Trabalhos realizados

2.1

hMLH1 and hMSH2 gene mutations in Brazilian families with suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer.

submetido: Annals of Surgical Oncology – fevereiro / 2001.

***hMLH1* and *hMSH2* gene mutation in Brazilian families with
suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer**

Benedito Mauro Rossi, M.D., Ph.D., FACS, CSSO (1)

Ademar Lopes, M.D., Ph.D., FACS, FSSO (1)

Fabio de Oliveira Ferreira, M.D., Ph.D. (1)

Wilson Toshihiko Nakagawa, M.D., M.S.(1)

Cláudia C. Napoli Ferreira (2)

José C. Casali da Rocha, M.D. (3)

Catarina C. Simpson (4)

Andrew G. J. Simpson, Ph.D.(5)

(1) Departamento de Cirurgia Pélvica

(2) Registro de Câncer Colorretal Hereditário

(3) Departamento de Oncogenética

(4) Laboratório de Biologia Molecular - CATG

(5) Laboratory of Cancer Genetics - LICR

From the Hospital do Câncer A.C.Camargo - Fundação Antonio Prudente and Ludwig Institute for Cancer Research (LICR), São Paulo - Brazil.

Reprints and Correspondence to

Benedito Mauro Rossi, M.D., Ph.D., FACS, CSSO

Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer A.C.Camargo

Departamento de Cirurgia Pélvica

Rua Prof. Antonio Prudente, 211

01509-010 - São Paulo

Brazil

Key words

HNPCC, Lynch Syndrome, hereditary colorectal cancer, mutation detection, *hMSH2*, *hMLH1*, mismatch repair genes.

Abstract

BACKGROUND: 25 unrelated patients from Brazilian kindreds with suspected hereditary colorectal cancer (CRC) were searched for mutations in the *hMSH2* and *hMLH1* genes.

METHODS: From January/1995 to July/1999, the cases were grouped as follows: Amsterdam Criteria I or II; familial CRC; an early age of onset of CRC only; and an early age of onset of CRC with at least one or two relatives who have CRC or HNPCC related cancers; one case had multiple metachronous colon adenomas and renal cell carcinoma. All patients were studied with the use of Polymerase Chain Reaction (PCR) and direct sequencing of the mismatch repair (MMR) genes.

RESULTS: Ten mutations were detected (10/25 – 40%), 9 different, 7 novel. *hMLH1* had a higher mutation detection rate than *hMSH2* (8/25 or 32% vs. 2/25 or 8%). Only 3 of these families fulfilled the Amsterdam criteria I or II (3/10 or 30%).

CONCLUSION: The physician who deals with CRC must take into consideration the heredity issue with patients who present an early age of onset of the disease, or familial history of CRC or HNPCC related cancers, including gastric cancer, even without fulfilling the former Amsterdam I or II criteria, used for HNPCC clinical characterization.

Mini-abstract

Twenty-five unrelated patients from Brazilian kindreds with suspected hereditary colorectal cancer were searched for mutations in the *hMSH2* and *hMLH1* genes.

Ten mutations were detected (10/25 – 40%), 9 different , 7 novel. Only 3 of these families fulfilled the Amsterdam criteria I or II.

Introduction

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), or Lynch Syndrome, is an autosomal dominant cancer syndrome with high penetrance (80% to 85%). It is characterized by: an early age of onset of colorectal carcinomas (CRC); proximal predominance of colon cancer; multiple synchronous and metachronous CRCs; tendency to have multiple primary tumors, including endometrial carcinoma, small bowel carcinoma, transitional cell carcinoma of the ureter and the renal pelvis. Other less common extracolonic cancers can occur, such as carcinoma of the stomach, ovary and hepatobiliary (1-6).

HNPCC is a common cancer predisposition syndrome and accounts for around 7% of all CRC (7). The diagnosis is basically clinical, made by the characteristic family history. In 1991, the Amsterdam clinical criteria were proposed by the ICG-HNPCC (8), in an attempt to provide uniformity in the clinical diagnosis of HNPCC in collaborative studies:

- three or more relatives with histologically verified CRC, one of whom is a first-degree relative of the other two;
- CRC involving at least two successive generations;
- one or more CRC cases diagnosed before the age of 50 years;
- exclude familial adenomatous polyposis.

These were named Amsterdam Criteria I. The ICG former criteria were widely accepted, however, they have also been criticized, mainly for

excluding extracolonic cancers. Last year, the same group (ICG-HNPCC) proposed to add to the first criteria, the following extracolonic tumors:

- adenocarcinoma of the endometrium;
- small bowel carcinoma;
- transitional cell carcinoma of the renal pelvis or ureter.

These were named Amsterdam Criteria II. Adenocarcinoma of the stomach and ovary were excluded because of their low incidence (9).

Occasionally, a family does not have a history of hereditary CRC, or family history is not available. In such cases, if the proband has a suspect tumor presentation (right sided, young age, synchronous or metachronous CRC or extracolonic tumors related to HNPCC), a “de novo” germline mutation should be considered (10,11).

The only known cause of HNPCC is the occurrence of inherited mutation in one of the following mismatch repair (MMR) genes: *hMSH2* (human mutS homolog 2), in chromosome band 2p16 (12,13); *hMLH1* (human mutL homolog 1), in 3p21 (14,15); *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1), in 2q31-33 (16); *hPMS2* (human postmeiotic homolog 2), in 7p22 (16); *hMSH6/GTBP* (human mutS homolog 6), in 2p16 within 0.5 megabase from *hMSH2* (17,18). Among these genes, *hMSH2* and *hMLH1* account for the great majority of mutations currently known in HNPCC families worldwide, reaching 90% in some series (19). The involvement of the other DNA MMR genes is rare (20).

Microsatellite instability (MSI), the widespread and frequent mutation of short repetitive regions within the genome, occurs in 85% to 95% of HNPCC tumors (21). MSI and clinical phenotypes have been proposed to be used for identification of potential HNPCC families, even when the Amsterdam criteria I or II are not fulfilled (11,22).

The aim of the present study is to identify mutations in *hMSH2* and *hMLH1* in 25 probands with suspected HNPCC, from different Brazilian kindreds, by means of direct sequencing of the coding regions of these genes.

Methods

Patients

Twenty-five patients with suspected hereditary CRC, from different Brazilian families, were consecutively enrolled from January/1995 to July/1999 at the Hospital do Câncer A.C.Camargo, Departamento de Cirurgia Pélvica, São Paulo, Brazil, and grouped according to the following criteria:

- 1) Five families that fulfilled the former Amsterdam I Criteria;
- 2) One family that fulfilled the former Amsterdam II Criteria;
- 3) Seven patients were classified as having familial CRC without fulfilling Amsterdam Criteria I or II. Although the Amsterdam criteria were not fulfilled, the patients had at least one relative with CRC, or with a HNPCC related cancer.
- 4) Eight patients were included because they presented at an early age (less than 50 years old), although they did not have affected relatives with CRC or HNPCC related cancers.
- 5) Three patients were included because they presented an early age (less than 50 years old), and at least one relative with CRC, or with a HNPCC related cancer, without fulfilling the Amsterdam Criteria I or II.
- 6) One patient was included because of rectal cancer, multiple metachronous colon adenomas and renal cell carcinoma

All families were registered at the Departamento de Cirurgia Pélvica Familiar CRC Registry. Genetic counseling was given to all families. The study was approved by the Hospital Ethics Committee. Blood samples were drawn for genetic tests only after signed informed consent.

All patients were studied by Polymerase Chain Reaction (PCR) amplification and sequencing of the complete *hMSH2* and *hMLH1* MMR genes

Genetic Tests

Sequencing

DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by phenol-chloroform extraction. PCR amplification of each exon of the *hMSH2* and *hMLH1* genes was undertaken that included all splice donor and acceptor sites (exon-intron boundaries). Sequences, reactions conditions and specific primers are available from the authors upon request.

The PCR products were directly sequenced on an ABI 377 sequencer (Perkin Elmer/Applied Biosystems) using Big Dye terminator chemistry on both strands using reagents obtained from Perkin Elmer/Applied Biosystems, according to the manufacturer's specifications.

Results

Table 1 shows the main characteristics of each case, including age of diagnosis, gender, synchronous or metachronous tumors, family history, staging and the sequencing results of the *hMLH1* and *hMSH2* MMR genes.

Ten mutations were detected amongst the 25 patients examined, with a detection rate of 40% (10/25). Of nine different mutations, seven are novel. Patients 7 and 8 presented the same missense mutation in *hMLH1*, exon 19, codon 718, with a change at nucleotide 2152 (C>T, His>Tyr). Two other novel missense mutations in *hMLH1* were found in patients 1 and 4, respectively: exon 11, codon 338, with a change at nucleotide 1013 (A>G, Asn>Ser); and exon 16, codon 603, with a change at nucleotide 1808 (C>G, Pro>Arg). The missense mutation detected in case 5 has been previously described (see Table 1). It consists of a change at nucleotide 1853 (A>C, Lys>Thr), codon 618, exon 16, also in the *hMLH1* gene. A novel nonsense mutation of the *hMLH1* was found in patient 6, who belonged to the only family that fulfilled the Amsterdam II criteria, in exon 18, codon 666, with a change at nucleotide 1998 (G>A, Trp>Stop). Case 2 presented a novel in-frame mutation of the *hMLH1* gene, exon 13, codons 500/501 (deletion of TCA at nucleotides 1499-1501). Another new *hMLH1* mutation was found in intron 13, generating a splice defect (G>T at nucleotide 1558 +1). Two new *hMSH2* protein truncating mutations were found in patients 9 and 10, respectively: exon 7, codon 417 (deletion of G

at nucleotide 1249), causing a stop at codon 437; and exon 11, codon 556 (insertion of A at nucleotide 1667), resulting in a stop at codon 561. Both cases belonged to families that fulfilled the Amsterdam I criteria. The mutations found were distributed throughout the coding regions of the *hMLH1* and *hMSH2* genes.

The genetic characteristics of the CRC kindreds fulfilling the different criteria were analyzed and some noteworthy points emerged. For example, a higher frequency of mutations were detected in *hMLH1* than in *hMSH2* (8/25 or 32% vs. 2/25 or 8%); among the 10 kindreds with germline mutations detected, only three fulfilled the Amsterdam criteria I or II (3/10 or 30%). No mutations were detected in the *hMLH1* and *hMSH2* MMR genes in the other three families that fulfilled the Amsterdam I criteria. Furthermore, we found no significant difference between the mean age of the CRC diagnosis in the groups with and without detected mutations (45.7 vs. 46.5). Among the group with detected mutations, 50% of the cases were diagnosed with rectal cancer, all of them with an *hMLH1* mutation, and 50% with a right sided colon tumor. Among the group without a detected mutation the tumor was located in the rectum in six cases, in left colon in five cases and right colon in four cases.

Table II shows the polymorphisms identified. Two polymorphisms were detected in *hMLH1*, one of them was found in 7 different patients (7/27 or 28%). Four different alterations were detected in *hMSH2* (frequency of 1/25 each).

Discussion

In Brazil, in contrast to Europe, it is very difficult to determine the exact origin of individual families. There is heterogeneous racial miscegenation, due to migration of Negroes from Africa as well as the Indians and to the Europeans themselves, mostly of Portuguese Italian origin. There are no previous studies of mutations of the *hMLH1* and *hMSH2* genes in Brazil. The present work, therefore, represents a first record of such mutations in Brazilian patients under HNPCC.

Lynch et al., in 1999, identified germ-line mutations in *hMLH1* or *hMSH2* in 18 of 56 families (18/56 i.e. 32.1%) clinically characterized as having HNPCC (23), slightly less than the proportion in the present study. Pensotti et al., in 1997, identified germ-line mutations in *hMLH1* or *hMSH2* in 8 of 16 families Italian descent with a clinical diagnosis of HNPCC (8/16 or 50%) (24).

Among the nine mutations detected in the 10 families in the present study, two have been previously described (patients 3 and 5), one by Han et al. in 1995 (25), and the other in Italy (unpublished: site ICG - HNPCC). However, the remaining seven were detected by us for the first time, although we have already published one in 1999 (26). Although patients 7 and 8 are unrelated, they presented the same missense alteration (His>Tyr, at nt 2152, *hMLH1*). Indeed, three of the new missense

mutations (patients 1, 4 and 7/8) should be studied in other members of the families to determine if they segregate with cancer, since missense mutations cannot be distinguished with precision from rare polymorphisms. Furthermore, the frequency of occurrence must be evaluated in normal individuals. The fourth missense mutation has been previously described by Han et al. in 1995 (25).

With regard to the proportion of mutations in *hMLH1* and *hMSH2*, Han et al. (27), in 1996, reported similar results in Korean families. Of 13 mutations identified, only one was in *hMSH2*, while 12 were in *hMLH1*. Among Japanese families, however, Bait et al. (11), in 1999, showed an inverse proportion, with a greater number of germ-line mutations in *hMSH2* than in *hMLH1* (11/1). All the families studied fulfilled the Amsterdam Criteria or the Japanese Criteria, and mutations were found in 12/37 (32.4%), close to the results of the present study. Peltomaki et al. (21), in 1997, also found a greater number of mutations in *hMLH1* as well as higher proportion of frameshift mutations in *hMSH2*. In the present study both mutations found in *hMSH2* resulted in protein truncation.

In the study described here, only 20% (5/25) of the families fulfill the Amsterdam I Criteria (8), of these, two (2/5 or 40%) showed germ-line mutations, both in *hMSH2* (patients 9 and 10). Only one family (patient 6) was characterized as Amsterdam II (9), with a germ-line mutation found in *hMLH1* (nonsense). Seven out of the 10 mutations (7/10 or 70%) found were in patients from families that did not fulfill the Amsterdam Criteria I

or II. These findings indicate that physicians attending patients who have CRC should not restrict themselves to the Amsterdam Criteria when considering an heredity diagnosis. On the other hand, we also insist on the clinical characteristics of HNPCC that follows the Amsterdam Criteria I or II. Therefore, if there is risk of heredity in a family, but without fulfilling the Amsterdam Criteria, the physician must be cautious when diagnosing heredity clinically until the molecular confirmation of the syndrome through genetic tests to identify the specific germ-line mutation. In 1997, the Bethesda Criteria (28) were published not to represent a clinical diagnosis, but rather to indicate those individuals eligible for genetic testing (microsatellite instability) due to risk of HNPCC.

Of the 8 patients indicated for genetic testing due to early CRC only, three presented mutations in *hMLH1* or *hMSH2* (3/8 or 37.5%), a result similar to that was obtained in patients of families that fulfilled the Amsterdam I or II Criteria. Therefore, the early age of CRC diagnosis must alert the physician, mainly in small families or those difficult to characterize that HNPCC is a possibility (24). Our results did not show meaningful differences in the age of diagnosis between the group with detected germ-line mutations and those without (45.7 vs 46.5). Fitzgibbons et al. (29) found that the mean age of the CRC diagnosis in patients with HNPCC to be 45.6 years. We cannot rule out the possibility of "de novo" germ-line mutations, i.e., the first mutation occurrence within a family, which could explain isolated cases of CRC in young patients, with no

previous occurrence in the family but positive genetic tests. In such isolated cases with identified germ-line mutations, the same mutation should be searched for in the parents (if negative, "de novo" mutation is confirmed) and in the family members for the diagnosis of carriers.

Of three patients with early CRC, but without a typical HNPCC family history, mutations were found in one individual (1/3 or 33.3%), which reinforces the possibility of heredity in cases of early CRC. Likewise, of seven patients whose family background did not fulfill the Amsterdam Criteria and CRC diagnosis was after 50 years of age, three showed mutations in *hMLH1* or *hMSH2* (3/7 or 42.9%). Even in these situations, HNPCC should be taken into consideration.

Although the diagnosis of gastric cancer is not in the Amsterdam Criteria, it is part of the syndrome. Of 10 families that had germ-line mutations, two presented with individuals with gastric tumors (2/10 or 20%). One family presented an in frame-type deletion and the other a missense mutation.

Rectal cancer was diagnosed in five of ten patients who had germ-line mutations (5/10 or 50%), all of them in *hMLH1* (5/8 or 62.5% of the *hMLH1* mutations). There is no precedence for this finding in the literature, so could be a population feature, to be confirmed through gene segregation with the rectal tumor in the other members of the families that suffer from this disease. The other five patients with detected germ-line mutations presented right sided colon tumors (5/10 or 50%).

Of ten patients with germ-line mutations, six presented with CRC stage I or II (T1-3N0N0) and only one with stage III (N1-2) (30). In three cases, staging could not be defined because of previous surgeries. Early CRC stage could be associated with HNPCC and carries the better prognosis.

One way of screening CRC patients who might have HNPCC is to research the microsatellite instability (MSI) in the tumor tissue (31), based on the Bethesda Criteria (28). Most cases of CRC with germ-line mutations present MSI (85% to 95%) (22). However, MSI also occurs in patients who have sporadic CRC. Nevertheless, the use of simple approaches such as testing for mutations in patients who have suspected HNPCC (eg. MSI - BAT 26) is clearly now indicated as a standard procedure. Patients with MSI should be considered candidates for mutation detection. If a patient with CRC belongs to a typical HNPCC family according to the Amsterdam Criteria, the sequencing of *hMLH1* and *hMSH2* should be considered as a first option for the molecular diagnosis. In those cases, when *hMLH1* and *hMSH2* are normal, the mutation research in *hMSH6* (also called *GTBP*) must be taken into consideration (19). Some mutations in *hMSH6* are related to cancer accumulation (CRC, gastric, endometrial, pancreatic) (32-34).

The polymorphism "Ile>Val", exon 8, codon 219 of *hMLH1* is reported with a frequency of 13% to 34% (35,36). We found 28% (7/25) of our samples with this alteration, showing that it is common in Brazilian

families. A polymorphism in *hMSH1* intron 13 was previously described by Tannergard et al. (36), but we require a population study to define its frequency in Brazil. In the *hMSH2* gene four polymorphisms were found, one described by Borresen et al. in 1995 (37) and the other by Liu et al. in 1998 (38), and two new ones, each showing an incidence of 1/25 in our samples.

Genetic tests are only one part of the process of our management of patients and families with hereditary CRC. After clinical suspicion of hereditary CRC, the patient is questioned as to detailed family history. Preferably together with other older family member who may provide supplementary information about distant members of the family, or about those who may have already died. As much data as possible is collected including names, dates of birth and death, causes of death, associated diseases, and surgeries. In this first consultation the pedigree background is established and recorded in the Institutional Data Bank. Following this consultation genetic testing consisting of MSI or sequencing of *hMLH1* and *hMSH2* can be indicated following signed inform consent. After the results of the tests are released, they are handed to the patient confidentially, and a process of the family orientation, clinical attendance and psychological support is provided. Lynch et al. (23) and other authors (39,40) proposes a similar support to these families. It is important to call to attention that the risk of cancer predisposition is based in clinical data and family history, and the absence of mutation detected in a family clinically

featured as HNPCC by Amsterdam Criteria does not reduce or eliminate the risk of having the disease. However, the germ-line mutation detection helps the support of the carriers.

In summary, we have found a greater prevalence of germ-line mutations detected in *hMLH1* gene than in *hMSH2* in the Brazilian families. In addition to the Amsterdam Criteria I and II, that define the clinical diagnosis of HNPCC, the physician in Brazil should also consider HNPCC when a patient is young and has CRC, or a patient has CRC and family history of HNPCC, even if it is non-typical, with specific attention being given to gastric tumors.

References

1. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum*, 1988; 31: 439-444.
2. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an updated review. *Cancer*, 1996; 78: 1149-1167.
3. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives: review. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87: 1114-1125.
4. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Lahti MN, Järvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer (Pred Oncol)* 1995; 64: 430-433.
5. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut*, 1992; 33: 783-786.
6. Tomoda H, Baba H, Oshiro T. Clinical manifestations in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1996; 61: 262-266.

7. Rossi BM, Corvello CM, Anelli A et al. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *South-American Journal of Cancer*, 1: 191-7, 1997.
8. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34: 424-425.
9. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterol* 1999; 116: 1453-1456.
10. Rossi BM, Pinho MSL, Nakagawa WT, Johnson LFP, Lopes A. Hereditary colorectal tumors. *Rev Col Bras Cir* 1998; 25: 271-280.
11. Bai YQ, Akiyama Y, Nagasaki H et al. Predominant germ-line mutation of the *hMSH2* and *hMLH1* gene in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. *Int J Cancer*, 1999; 82: 512-515.

12. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS et al. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*, 1993; 75: 1027-38.
13. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*, 1993; 75: 1215-25.
14. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*, 1994; 368: 258-261.
15. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF et al. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994; 263: 1625-29.
16. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B et al. Mutations of two *PMS* homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*, 1994; 371: 75-80.
17. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an *hMSH2*-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, 1994; 268:1909-12.

18. Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I et al. *GTBP*, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science*, 1995; 268: 1912-14.
19. Planck M, Koul A, Fernebro E et al. *hMLH1*, *hMSH2* and *hMSH6* mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from Southern Sweden. *Int J Cancer*, 1999; 83: 197-202.
20. Lu SL, Kawabata M, Imamura T, Akiyama Y, Nomizu T, Miyazono K, Yuasa Y. HNPCC associated with germline mutations in the TGF- β type II receptor gene. *Nature (Genet)* 1998; 19: 17-19.
21. Peltomäki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology*, 1997; 113: 1146-1158.
22. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998; 338: 1481-1487.
23. Lynch HT, Watson P, Shaw TG et al. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part I: studies of cancer families. *Cancer*, 1999; 86: 1629-36.

24. Pensotti V, Radice P, Presciuttini S et al. Mean age of tumor onset in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC) Families correlates with presence of mutations in mismatch repair genes. *Genes Chromsom Cancer*, 1997; 19: 135-42.
25. Han HJ, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair gene, *hMLH1*, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 1995; 4: 237-42.
26. Corvello CM, Bevilacqua RAU, Rossi BM, Simpson AJG. A novel mutation at exon 7 of the *MSH2* gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred. *Hum Mut* 1999; 13: 506-8.
27. Han HJ, Yuan Y, Ku JL et al. Germ-line mutations of *hMLH1* and *hMSH2* genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Nat Cancer Inst* 1996; 88: 1317-9.
28. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1758-62.

29. Fitzgibbons RJ, Lynch HT, Stanislav GV et al. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer. (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987; 206: 289-95.
30. Sobin, LH. editor. *Classificação dos tumores malignos (TNM)*. 5.ed. Rio de Janeiro: Coordenação de Programas de Controle do Câncer; 1998. p. 72-5 : cancer colorretal.
31. de la Chapelle A. Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genet* 1999; 7: 407-8.
32. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the *hMSH6/GTBP* gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997; 57: 3920-3.
33. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K et al. Germ-line mutation of *MSH6* as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature (Genet)*, 1997; 17: 271-2.

34. Shin KH, Ku JL, Park JG. Germ-line mutations in a polycytosine repeat of the *hMSH6* gene in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Hum Genet* 1999; 44: 18-21.
35. Liu B, Nicolaidis NC, Markowitz S et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nature Genet* 1995; 9: 48-55.
36. Tannergard P, Lipford JR, Kolodner R, Frodin JE, Nordenskjold M, Lindblom A. Mutation screening in the *hMLH1* gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 1995; 55: 6092-96.
37. Borresen AL, Lothe RA, Meling GI et al. Somatic mutations in the *hMSH2* gene microsatellite unstable colorectal carcinomas. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2065-72.
38. Liu T, Wahlberg S, Rubio C, Holmberg E, Gronberg H, Lindblom A. DGGE screening of mutations in mismatch repair genes (*hMLH1* and *hMSH2*) in 34 Swedish families with colorectal cancer. *Clin Genet* 1998; 53: 131-5.

39. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, Vachon C, Ahrens M, Potter JD, Sumpmann M. Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancers Centers. *J Nat Cancer Inst* 1995; 87: 1446-55.

40. Burke W, Petersen G, Lynch P et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. *JAMA* 1997; 277: 915-9.

id	age/ sex	CRC location	other tumors	family history	CRC staging TNM-97	mutation					
						MMR gene	exon	codon	nucleotide change	consequence	references
1	38/F	rectum	no	father: lymphoma uncle: CRC	T3N2M0G1	<i>hMLH1</i>	11	338	A>G at nt 1013	Asn>Ser (missense)	new
2	60/F	right colon	no	sister: breast 3 nephews: 2 gastric, 1 pancreas	unknown	<i>hMLH1</i>	13	500/ 501	del TCA at nt 1499- 1501	In-frame	new
3	42/F	right colon left colon	no	no	vilous T1N0M0G1 vilous T1N0M0G1	<i>hMLH1</i>	intron 13	---	G>T at nt 1558 +1	splice defect	Italy (unpublished) site: ICG-HNPCC
4	70/M	rectum	no	sister: colon 2 nephews: gastric	T2N0M0G2	<i>hMLH1</i>	16	603	C>G at nt 1808	Pro>Arg (missense)	new
5	42/F	rectum	no	no	T2N0M0G2	<i>hMLH1</i>	16	618	A>C at nt 1853	Lys>Thr (missense)	(25)
6	42/M	right colon	no	Amsterdam II	unknown	<i>hMLH1</i>	18	666	G>A at nt 1998	Trp>Stop (nonsense)	new
7	27/M	rectum	no	adopted	unknown	<i>hMLH1</i>	19	718	C>T at nt 2152	His>Tyr (missense)	new
8	55/M	rectum	no	grandmother: colon at 45y	T2N0M0G1	<i>hMLH1</i>	19	718	C>T at nt 2152	His>Tyr (missense)	new
9	41/F	right colon	no	Amsterdam I	mucous T3N0M0G1	<i>hMSH2</i>	7	417	del G at nt 1249	frameshift stop at codon 437	(26)
10	40/F	right colon	colon adenoma bladder carcinoma	Amsterdam I	mucous T3N0M0G1	<i>hMSH2</i>	11	556	ins A at nt 1667	frameshift stop at codon 561	new
11	52/M	rectum	melanoma	father: colon sister: rectum sister: ovary	T2N0M0G1	no					
12	42/M	left colon	multiple colon adenomas skin adenomas	Amsterdam I	mucous T3N0M0G1	no					
13	63/F	left colon	no	Amsterdam I	T3N0M0G2	no					
14	55/F	left colon	no	uncle: colon uncle: uterus(?)	T1N1M0G2	no					
15	45/M	right colon	no	no	T4N0M0GX	no					
16	65/M	rectum	no	Amsterdam I	T3N1M0G2	no					
17	33/F	rectum	no	one generation: 5 brother: CRC 1 sister: uterus	T1N0M0G1	no					
18	36/M	right colon	no	mother: uterus(?)	T3N0M0Gx	no					
19	64/M	rectum	No	two 1st degree: CRC	T1N0M0G1	no					
20	29/M	right colon	no	no	T2N0M0G2	no					
21	28/M	right colon	no	no	T3N0M0G2	no					
22	45/M	rectum	no	uncle: rectum	T4N0M0G2	no					
23	69/M	rectum	multiple colon adenomas renal carcinoma	unknown	T2N0M0G1	no					
24	18/F	left colon	no	no	T3N0M0G2	no					
25	53/M	left colon	no	father: gastric sister: uterus(?)	T3N0M1GX (M: liver)	no					

(?) doubt: endometrium or cervix

Table 2 - *hMLH1* and *hMSH2* polymorphisms in Brazilian probands with suspected HNPCC.

exon	gene	nucleotide change	frequency	references
<i>hMLH1</i>				
8	codon 219	ATC>GTC at 655 (Ile>Val)	7/25 (28%)	(36, 37)
intron 13	+14 of 3' exon 13	g>a at 1558 +14	1/25	(37)
<i>hMSH2</i>				
2	codon 113	AAG>AAA at 339 (Lys>Lys)	1/25	(39)
5	codon 273	GTA>GTG at 819 (Val>Val)	1/25	new
intron 1	+8 of 3' exon 1	g>c at 211 +8	1/25	new
intron 9	-9 of 5' exon 10	t>a at 1511 -9	1/25	(38)

2.2

A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred.

publicado: Human Mutation, 13: 506-8, 1999.

Mutation and Polymorphism Report

Title : A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred
Authors: Cassandra M. Corvello¹, Roberta A.U. Bevilacqua¹, Benedito M. Rossi², Andrew J.G. Simpson¹
Affiliations: ¹ Laboratory of Cancer Genetics, Ludwig Institute for Cancer Research and ²Department of Pelvic Surgery, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, SP, Brazil
Species: Homo sapiens

Gene/Locus

Name: MutS homologue 2 (mismatch repair)
Symbol: MSH2
HUGO-approved when available
Genbank accession number: U03911

OMIM accession number: 120435
Locus specific database: GDB 203983
 web address when available

Chromosomal location: 2p16
e.g., 12q24.1

Inheritance: germinal
Mutation / polymorphism name: 1249delG

To follow nomenclature guide.
Nucleotide change-Systematic name: c.1249delG
 Sequential no. in genomic or cDNA sequence. *e.g., c1227c->T*

Amino acid change-Trivial name: 437X
 Codon number and change. *e.g., R108W*

Mutation / polymorphism type: deletion of 1 bp, frameshift
 Missense, deletion, splice, etc.

Polymorphism frequency: no, family sample
e.g., 40/60 C/T

Detection method: SSCP and sequencing
 DGGE, etc.

Detection conditions

sequence of primers: MSH2-7F- 5' ttaattcaagttaattattcag 3'
 MSH2-7R- 5' tcactgttaccttcagttt 3'
PCR conditions: 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 54°C and 1 min at 72°C, and a final extension step of 5 min at 72°C.
electrophoresis: The PCR products were denatured at 95°C for 5 min and loaded on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel.

Diagnosis method developed: No
 ASO, etc.

Evidence for existence and effect (mutation) or lack of effect (polymorphism):

	Yes	No	Don't know
1. Mutation found on repeat PCR sample	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
2. Mutation segregates or appears with trait	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
3. Mutation affects conserved residue	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>



- 4. Expression analysis supports hypothesis
- 5. Mutation not found in 50 normal subjects
- 6. Polymorphism

Ancillary data

1. **Haplotype association :**
2. **Population association :**
3. **Geographic association :**
4. **Clinical phenotype of proband :** Colorectal cancer diagnosed at 40 years of age in a female with family history of HNPCC
5. **Homologous allele (if recessive trait):**
6. **Frequency:**
7. **PIC:**
8. **Ethnic background:** Caucasoid, Brazilian
9. **Other:**
10. **Present in HGMD listing:** Yes No
(<http://www.cf.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>)

Comments

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome that has been associated with germline mutations in five DNA mismatch repair (MMR) genes: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* and *MSH6* (Marra and Boland, 1995; Miyaki et al., 1997). Recently, a missense mutation was described in the TGF- β type II receptor (*TGFBR2*) gene in an HNPCC kindred without microsatellite instability (Lu et al., 1998). Here, we report a novel germline mutation in the *MSH2* gene in a member of a large Brazilian kindred that fulfil the Amsterdam criteria for HNPCC (Vasen et al., 1991) and with seven cases of colorectal cancer in two generations. The proband is a caucasian female with colorectal cancer diagnosed at 40 years of age and has two first-degree relatives (father and one brother) with colon cancer. The SSCP analysis of the exon 7 of the *MSH2* gene showed an extra single-stranded band present in the DNA sample from the affected individual. Direct sequencing of PCR products of exon 7 demonstrated a G deletion at codon 417 (1249delG) that results in a MSH2 protein truncated at position 437 (GenBank accession no. AF066081).

Acknowledgments

We thank Ricardo P. Moura for technical assistance and the family that participated in this study. CMC holds a Brazilian Research Council (CNPq) post-doctoral fellowship.

References

- Lu S-L, Kawabata M, Imamura T, Akiyama Y, Nomizu T, Miyazono K, Yuasa Y (1998) HNPCC associated with germline mutation in the TGF- β type II receptor gene. *Nature Genet* 19: 17-18.
- Marra G, Boland CR (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87: 1114-1125.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genet* 17: 271-272.
- Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34: 424-425.

Keywords

MSH2 gene, HNPCC, colorectal cancer, germline mutation

Corresponding Author Information (address, phone, fax, e-mail)

Cassandra M. Corvello, PhD
Ludwig Institute for Cancer Research
R. Prof. Antônio Prudente, 109 - 4 andar
São Paulo, SP, Brazil 01509-010

2.3

Tumores Colorretais Hereditários. Artigo de Revisão.

publicado: Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões

25: 271-80, 1998.

TUMORES COLORRETAIS HEREDITÁRIOS

HEREDITARY COLORECTAL TUMORS

Benedito Mauro Rossi, TCBC-SP¹
Mauro de Souza Leite Pinho, TCBC-SC²
Wilson Toshihiko Nakagawa¹
Luis Fernando Pinto Johnson¹
Ademar Lopes, TCBC-SP³

RESUMO: Cerca de 4% a 15% dos tumores colorretais são hereditários e divididos em dois grupos: polipose adenomatosa familiar (FAP) e câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). Ambas são doenças autossômicas dominantes, com transmissão vertical, geração após geração, sem preferência por sexo. A FAP tem penetrância praticamente completa, caracterizada por mais de cem pólipos adenomatosos no intestino grosso, que aparecem em geral após a puberdade e se transformam em câncer em todos os casos não tratados, levando o paciente ao óbito em torno dos 45 anos de idade. Manifestações extracolônicas são comuns, tais como: pólipos em estômago e duodeno, sarcomas abdominais, pigmentação de retina, osteomas, entre outras. A FAP é causada por mutação no gene *APC*, que está localizado no cromossomo 5q. Seu tratamento é basicamente cirúrgico, com retirada do intestino grosso, podendo-se preservar o reto, se este não apresentar muitos pólipos. O HNPCC tem penetrância em torno de 80% e não apresenta os pólipos benignos como na FAP, que permitem identificar pacientes com o fenótipo da doença. Geralmente, o diagnóstico da lesão colônica é realizado já na fase maligna, em torno dos 45 anos de idade, com preferência para o lado direito do cólon. Pode haver associação com tumores de endométrio na mulher, estômago, pâncreas, entre outros. É causada por mutação em genes de reparo do DNA (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6/GTBP*). A colectomia total deve ser realizada em pacientes com câncer de cólon e HNPCC. Se o tumor estiver localizado no reto, a proctocolectomia total pode ser uma opção. Em indivíduos portadores do defeito genético predisponente ao HNPCC, porém, assintomáticos, a indicação de cirurgias profiláticas é controversa. Atualmente, podem-se identificar indivíduos portadores de defeito genético herdado tanto na FAP como no HNPCC. Esses testes baseiam-se no estudo direto dos genes responsáveis pela respectiva doença ou pela proteína produto dos mesmos. É de suma importância uma abordagem multidisciplinar de pacientes portadores de FAP ou HNPCC, pois existe uma preocupação ética muito grande na realização dos testes genéticos de predisposição, considerando suas conseqüências psicológicas e sociais.

Unitermos: Polipose adenomatosa familiar; FAP; Adenoma; Câncer colorretal hereditário sem polipose; HNPCC; Testes genéticos.

INTRODUÇÃO

O organismo humano é composto por células somáticas e germinativas. As células somáticas dividem-se por mitose, constituindo a maior parte dos tecidos humanos. No intestino grosso, o objetivo maior das mitoses é a reposição das células da mucosa que morrem naturalmente de forma programada,

processo chamado de apoptose. As células germinativas dividem-se por meiose, sendo representadas pelos gametas, ligados à reprodução e transmissão de características hereditárias, inclusive defeitos genéticos predisponentes para tumores colorretais.

A carcinogênese colorretal é complexa, multicausal e composta de várias fases. Entre os possíveis agentes causais

1. Médico Titular do Departamento de Cirurgia Pélvica
2. Cirurgião do Departamento de Cirurgia do Hospital São José de Joinville - SC.
3. Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica.

Recebido em 3/2/97

Aceito para publicação em 22/6/98

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

estão os fatores extrínsecos, principalmente relacionados à dieta rica em gorduras animais e pobre em fibras vegetais, que podem levar as células colônicas a mutações genéticas adquiridas, também chamadas de somáticas. Mutações herdadas, ou germinativas também podem ser consideradas como fatores causais iniciais importantes no aparecimento do câncer colorretal (CCR), pois indivíduos que já nascem com esses defeitos genéticos têm os primeiros passos da carcinogênese completos, aumentando a chance e diminuindo o tempo para o aparecimento do tumor.¹

Não houve alteração significativa na taxa de cura do CCR nas últimas décadas, porém, com os avanços no campo da genética molecular enfocando principalmente a progressão tumoral, o entendimento dos mecanismos de carcinogênese torna-se dia a dia mais próximo. Alguns estudos demonstram claramente que o câncer é uma doença genética, ou seja, relacionada a mutações nos genes que comandam o equilíbrio da divisão celular.² Esse equilíbrio é dado basicamente pelo funcionamento harmônico de dois tipos de genes: os *oncogenes* e os *genes supressores de tumor*. O primeiro grupo estimulando e o segundo freando a divisão celular.

O CCR quase sempre tem início em pólipos adenomatosos,¹ e entender o processo de transformação dessas lesões não é função apenas de biólogos moleculares, pois todos os profissionais envolvidos no tratamento dos pacientes devem estar afeitos à essa fisiopatologia. Além das alterações genéticas predisponentes ao CCR estarem relacionadas ao prognóstico de sobrevida, seu conhecimento abre novos caminhos para o diagnóstico pré-clínico da doença, possibilitando a identificação, acompanhamento e tratamento precoce dos pacientes.

TUMORES COLORRETAIS HEREDITÁRIOS

A incidência de CCR no Brasil em 1996 foi de 17 mil casos novos, com uma discreta predileção pelo sexo feminino.³ Esse número demonstra que é o quinto tumor mais frequente, ficando atrás do câncer de mama, estômago, pulmão e colo uterino.³ Atualmente, existe controvérsia sobre a incidência do CCR hereditário, com variação na literatura entre 6% e 15%.⁴ Assim sendo, se considerarmos a incidência global de CCR no Brasil em 1996 somaríamos um total absoluto entre 1.020 e 2.550 casos de tumores hereditários por ano.

Os CCR hereditários podem ser divididos em dois grupos: a polipose adenomatosa familiar (FAP), que representa cerca de 1%, e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), que representa entre 5% e 14% das causas de câncer no intestino grosso.¹⁰⁻¹²

Essa variação de incidência está na dependência do critério usado para caracterização do HNPCC, alguns mais rígidos, outros mais maleáveis. É de suma importância que critérios padronizados internacionalmente sejam estabelecidos e seguidos, pois só assim saberemos a verdadeira incidência da doença.

Polipose adenomatosa familiar (FAP)

A FAP é uma doença autossômica dominante, com penetração próxima de 100%, e se caracteriza pela presença de mais de cem pólipos adenomatosos no intestino grosso, podendo esse número chegar até a milhares.⁵ (Figura 1).

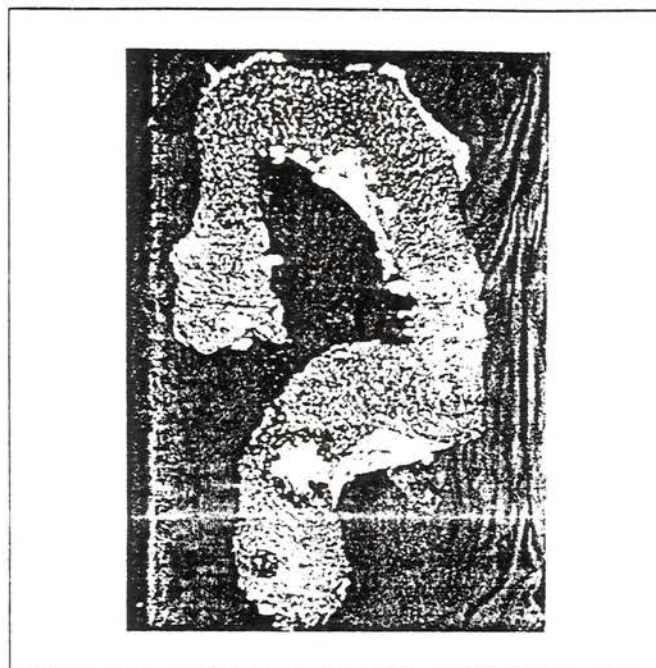


Figura 1 – Peça cirúrgica de proctocolectomia total demonstrando polipose adenomatosa familiar com área de transformação carcinomatosa em reto alto

Geralmente, os pólipos começam a crescer após a puberdade, com manifestações clínicas entre a terceira e quarta décadas de vida, sendo que a transformação maligna ocorre em todos os casos não tratados (Figura 1), levando ao óbito, em média, em torno dos 45 anos de idade.⁵ Porém, existe descrição de criança abaixo de 10 anos de idade com FAP estabelecida, apresentando deleção de cinco pares de base no códon 1309 do gene *APC*.⁶

Podem ocorrer, com incidência variável, outras manifestações clínicas associadas em pacientes portadores de FAP. Pólipos em outras localizações do trato gastrointestinal, principalmente no duodeno e região da papila duodenal, são extremamente comuns, com incidência em torno de 70% dos pacientes com FAP. Após o diagnóstico endoscópico, esses pacientes devem ser seguidos rigorosamente e submetidos à ressecção de qualquer lesão suspeita, tanto pelo seu tamanho como pelo crescimento rápido, pois elas apresentam potencial de malignização.⁷

Osteomas também podem ocorrer, geralmente em mandíbula ou maxila, como demonstrado na figura 2; porém, espessamentos corticais de ossos longos são os achados mais comuns em algumas séries, podendo ser a única manifestação extracolônica da FAP.

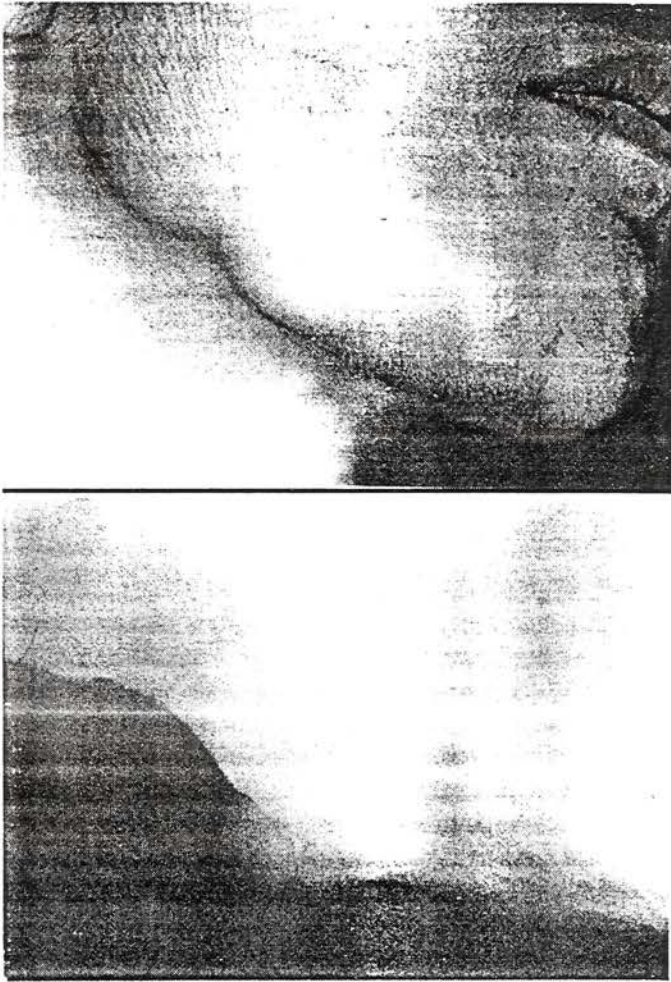


Figura 2 – Paciente portador de FAP com osteoma de mandíbula e radiografia simples correspondente

Lesões pigmentadas de retina são comuns, chegando a acometer cerca de 80% dos casos de FAP ao nascimento, podendo servir como um bom marcador clínico congênito para o diagnóstico da doença, principalmente nos casos onde as mutações ocorrem na porção proximal do exon 15 do gene *APC*.⁸

Lesões de pele, geralmente descritas como cistos sebáceos, também são relatadas como mais comuns na face, pescoço e braços, porém, podem ocorrer em qualquer parte do corpo e com incidência variável.

Os fibrossarcomas de baixo grau de malignidade, também chamados na literatura de tumores desmóides, ocorrem em cerca de 10% dos pacientes com FAP. Geralmente são intra-abdominais (mesentéricos ou de parede abdominal) e constituem importante causa de morte em casos tratados dos pólipos colônicos.⁹ O único tratamento efetivo para os tumores desmóides, apesar das altas taxas de recidiva, é o cirúrgico, através de uma ressecção adequada dentro dos padrões da cirurgia oncológica. O uso de medicações, tais como antiinflamatórios não hormonais, agentes antiestrogênicos e esteróides, tem sido indicado em casos irrisecáveis, porém, com resultados desanimadores a longo prazo na maioria dos casos.¹⁰

Tumores do sistema nervoso central também são descritos em associação com FAP (*Brain Tumor Polyposis* – BTP síndrome tipo 2), onde ocorrem mutações germinativas no gene *APC*. Outra síndrome, chamada BTP tipo 1, é descrita em pacientes portadores de gliomas e adenomas colorretais, mas sem a presença de polipose. Nestes casos não são encontradas mutações no gene *APC*, mas sim em genes de reparo, levando a erros de replicação no DNA, o que poderia sugerir associação com HNPCC.¹¹

Tumores de supra-renal têm sido descritos como mais incidentes em pacientes com FAP, mas esses achados podem ser devidos à realização rotineira de exames de imagem aumentando o número de casos diagnosticados involuntariamente.¹²

A associação da FAP com carcinoma papilífero de tireóide é rara, com descrição de menos de cinquenta casos na literatura, mas deve ser lembrada.¹³

A FAP é transmitida verticalmente, geração após geração, sem preferência por sexo, sendo que cada filho de um casal com um cônjuge portador da doença tem 50% de chance de desenvolver pólipos.⁵ É uma das doenças hereditárias mais estudadas atualmente, causada por alterações no gene supressor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q).¹⁴ O gene *APC* possui 8.538 nucleotídeos que codificam a proteína *APC*, com 2.843 aminoácidos e peso molecular de 311,8 kDa.¹⁵ Apesar das mutações herdadas que inativam o gene *APC* serem raras, como no caso da FAP (1% dos CCR), mutações somáticas ou adquiridas na mucosa colônica são comuns nesse gene em pacientes portadores de CCR esporádico. Essas mutações adquiridas do cromossomo 5q geralmente ocorrem às custas de perda de heterozigosidade (LOH), ou também chamada de perda alélica.^{1,16} Explicando melhor, quando analisamos o gene, apesar de apenas um dos alelos herdados estar afetado grosseiramente na célula tumoral (perda de alelo, por exemplo), a cópia remanescente do gene supressor no outro alelo, aparentemente normal, apresenta alterações mais sutis, tais como mutações pontuais, pequenas inserções ou deleções, levando à sua inativação.¹⁷ Cerca de 50% dos CCR esporádicos apresentam LOH para o cromossomo 5q, região em que está localizado o gene supressor *APC*.^{1,17} de forma muito semelhante às mutações encontradas nas famílias portadoras de FAP. Pequenos adenomas e cerca de dois terços de todos os CCR apresentam mutações no gene *APC*.^{1,17} Estudos preliminares parecem mostrar que o gene supressor *APC* tem uma ação na regulação da expressão do oncogene *c-myc*, e uma perda dessa regulação seria responsável pela hiperexpressão de *c-myc* no CCR.^{1,18}

Na FAP, as alterações mais comuns que ocorrem no gene *APC* são inserções ou mutações pontuais, geralmente no exon 15, que na maioria dos casos levam à produção de uma proteína *APC* truncada, sem a função da proteína selvagem ou original.¹⁴

Uma das famílias registradas no Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, apresenta uma mutação tipo inserção

no códon 1291, exon 15G, do gene *APC*, o que causa uma mudança na fase de leitura na fita de DNA, levando a um "stop codon" alguns nucleotídeos adiante, como demonstrado na Figura 3.⁴ Isso faz com que a proteína produzida não esteja completa (proteína truncada) e, conseqüentemente, sem sua função normal. No caso desta família houve manifestação de um fenótipo agressivo no intestino grosso, com vários casos de malignização de pólipos em idade precoce, e de várias manifestações extracolônicas (Figura 4).

Amostra	Exon	Codon	Inserção de "T"
SGO4	15G	1291	AAT CAG ACG → AAT CTA GAC

Proteína	>AAT CAG ACG ACA CAG GAA GCA GAT TCT GCT AAT >
Selvagem	Asn Gin Thr Thr Gin Gln Ala Asp Ser Ala Asn
	⇒
Proteína	> AAT CTA GAC GAC ACA GGA AGC AGA TTC TGC TAA >
Mutada	Asn Leu Ala Ala Thr Gly Ser Arg Phe Cys Stop

Figura 3 – Mutação no gene *APC* levando a uma proteína truncada em família com FAP

Graças ao desenvolvimento de testes que analisam proteínas sintetizadas *in vitro* (IVSP) ou testes de proteína truncada (PTT), hoje é possível detectar uma proteína defeituosa produto do gene *APC* alterado.¹⁵ Na análise IVSP, o DNA do indivíduo a ser testado é extraído de linfócitos do sangue periférico, amplificado e transcrito em RNA, o qual é traduzido na respectiva proteína, que por sua vez é estudada através de eletroforese em gel. Uma pessoa sem FAP, ou seja, com dois alelos normais, produz apenas uma banda no gel (os dois alelos produzem a mesma proteína APC normal); porém, um paciente portador de FAP, com mutação que leva a uma proteína truncada, produz duas bandas, uma conseqüente à proteína normal e outra à proteína truncada.²⁰

Pacientes com fenótipo de FAP, mas sem manifestações extra-intestinais, podem não apresentar proteína APC truncada, ao passo que mutações nos códon 1465, 1546 e 2621 estão associadas à multiplicidade das manifestações extracolônicas.²¹

Uma mutação comumente encontrada em FAP está localizada no códon 1309, no exon 15G do gene *APC*, associada com um fenótipo agressivo aparecimento mais precoce da doença e geralmente com necessidade de cirurgias mais amplas incluindo a retirada do reto.²²

Além desse teste, outra maneira de se realizar o teste genético para identificação de portadores de FAP é através do seqüenciamento direto do gene *APC*. Após a extração do DNA de linfócitos do sangue periférico, é realizada amplificação do segmento específico que contém o gene *APC* utilizando-se iniciadores de reação também específicos, através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Assim, utilizando-se seqüenciador automático computadorizado, teremos o gene *APC* de ponta a ponta, com todos os nucleotídeos, possi-

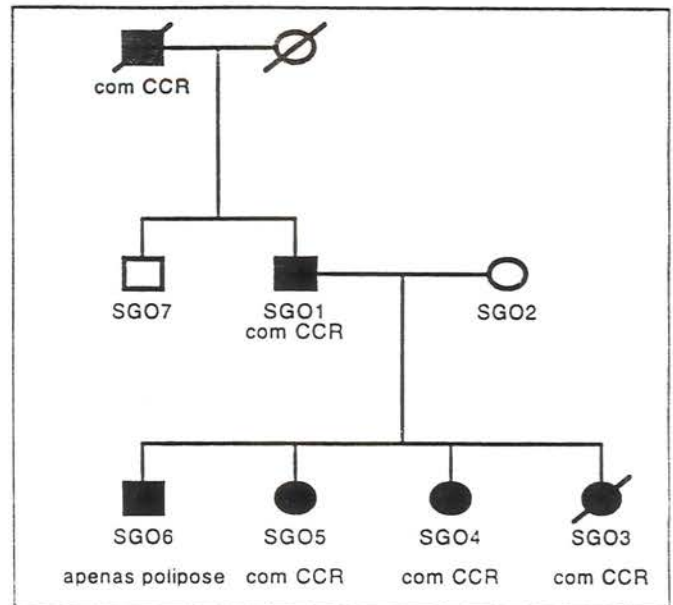


Figura 4 – Heredograma de família portadora de FAP com vários casos de CCR

bilitando a identificação de alterações sutis como a demonstrada na figura 3.

É de suma importância lembrar que o primeiro teste genético dentro de uma nova família de FAP deve ser realizado em um indivíduo sabidamente portador do fenótipo da doença. No caso de indivíduos sem o fenótipo da doença, poderíamos encontrar um resultado negativo para o teste e não saberíamos dizer se aquela família não possui a doença hereditária ou se aquele membro específico não herdou o defeito genético.

Tratamento da FAP

O tratamento de pacientes com FAP é basicamente cirúrgico, com a retirada do intestino grosso. Em pacientes com poucos pólipos no reto, este pode ser preservado, reconstruindo-se o trânsito intestinal com uma anastomose íleo-retal (colectomia total).²³ Pacientes submetidos a esse tipo de cirurgia devem ser acompanhados rigorosamente devido ao risco de transformação maligna dos pólipos adenomatosos retais remanescentes. Se durante o acompanhamento houver suspeita de transformação ou aumento dos pólipos retais, o paciente deve ser reoperado para retirada do reto, preferencialmente com preservação da função esfinteriana e da inervação pélvica.

No caso de muitos pólipos no reto, existe a necessidade de sua retirada de início. A cirurgia indicada é a proctocolectomia total com preservação da função esfinteriana e da inervação pélvica, sendo que a reconstrução do trânsito intestinal é realizada através de anastomose íleo-anal.

A realização de um reservatório ileal, usualmente em forma de "J", com a finalidade de aumentar a capacidade do paciente para reter as fezes⁴ se faz necessária, como demonstrado na figura 5.



Figura 5 – Radiografia contrastada demonstrando reservatório ileal em “J” utilizado para reconstrução do trânsito intestinal após proctocolectomia total em paciente portador de FAP

O reservatório ileal e as anastomoses podem ser realizadas através de suturas manuais ou mecânicas. No caso da anastomose mecânica, esta é realizada pela técnica do duplo grampeamento, que não permite a retirada do anel mucoso entre a linha pectínea e a linha de secção do reto. Acreditava-se que essa mucosa remanescente mantinha os riscos de malignização, porém, com o passar do tempo observou-se que este fato não ocorre na prática, consagrando a técnica do duplo grampeamento como sendo a de primeira escolha, exceto em casos onde o canal anal acarpitado de pólipos não permita sua realização. Nestes pacientes, a mucosectomia do canal anal (entre a linha pectínea e linha de secção do reto) deve ser realizada, tomando-se cuidado para não causar lesão do esfíncter interno do ânus, reconstruindo-se o trânsito intestinal através de uma anastomose coloanal transanal manual, como proposto por Parks.²⁴

Atualmente, existe uma tendência na indicação da proctocolectomia total, pois a morbidade cirúrgica é relativamente baixa, com falha da bolsa ileal em torno de 7,7%, geralmente por sepsé pélvica.²⁵ Essa cirurgia evita que o paciente sofra futura intervenção para retirada do reto, já que a chance de transformação maligna deste é de cerca de 25% em até 13 anos.²⁶ Em casos de FAP onde já existe a transformação maligna dos pólipos adenomatosos, a cirurgia deve seguir os padrões clássicos da cirurgia oncológica, no que diz respeito às margens, linfadenectomias regionais e ressecção fechada do mesorreto.

Existem medicamentos que visam causar a regressão dos pólipos do intestino grosso em pacientes com FAP. O mais conhecido é o sulindac, um antiinflamatório não-hormonal. Os resultados de tratamento utilizando-se essa droga são controversos, sendo que alguns estudos mostram respostas parciais nos pólipos localizados no coto retal após colectomia total. A mesma droga não tem ação na regressão de pólipos duodenais.²⁷

Com a evolução e a padronização do tratamento cirúrgico da FAP no que diz respeito ao intestino grosso, as causas de óbito desses pacientes têm mudado nos últimos anos, deixando de ser por CCR e passando a ser geralmente devido às manifestações extracolônicas, principalmente os sarcomas abdominais.²⁸

Por se tratar de uma doença hereditária, como já vimos, causada por defeito genético específico, acreditamos que qualquer tratamento clínico que não tenha ação diretamente na célula, no sentido de corrigir a falha do DNA, terá no máximo um efeito transitório.

Câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC)

Descrita pela primeira vez há um século por Aldred Warthin, através da “Família G”, o HNPCC é uma doença autossômica dominante, com penetrância entre 80% e 90%, transmissão vertical e sem preferência por sexo.²⁹ Os pacientes não apresentam as centenas de pólipos adenomatosos como na FAP, o que dificulta a identificação clínica de portadores da doença; assim sendo, o diagnóstico geralmente é realizado já na presença de CCR.

Alguns estudos demonstram que a evolução do adenoma para o adenocarcinoma ocorre de forma mais rápida comparativamente às lesões esporádicas.⁵ Muto et al³⁰ sugerem que na população essa transformação demore entre 10 e 15 anos para ocorrer. Porém, em pacientes com HNPCC esse processo seria mais acelerado pela falta de eficiência nos processos naturais da célula no reparo do DNA,³¹ o que tornaria os adenomas mais agressivos.³² Apesar disso, relatos de transformação maligna em intervalo menor que dois anos são raros.

Quando comparamos HNPCC com CCR esporádico, notamos predileção para acometimento do cólon direito (68% versus 49%), maior incidência de CCR sincrônico (7% versus 1%), maior incidência de CCR metacrônico em dez anos (29% versus 5%), manifestação mais precoce da doença, geralmente entre 40 e 45 anos de idade, além de melhores resultados de sobrevida em cinco anos, talvez explicados pelo maior número de diagnósticos precoces nestas famílias.³³ Pode haver associação com tumores de estômago, pâncreas, pelve renal, intestino delgado e de endométrio na mulher.^{5,34} Muitas vezes, o aparecimento de tumores extracolônicos em outros membros da mesma família podem indicar a presença da doença, apesar dos critérios de Amsterdam não incluírem essas lesões.

Segundo os critérios de Amsterdam, o diagnóstico clínico do HNPCC deve ser realizado baseado nas seguintes características da família: três membros com CCR em duas gerações diferentes, sendo que um deles deve ser parente em primeiro grau dos outros dois e um deles com menos de 50 anos de idade. Atualmente, existe controvérsia quanto à necessidade de cumprimento integral desses critérios para a caracterização da HNPCC, pois poderíamos deixar de realizar o diagnóstico em muitas famílias onde existem evidências de CCR hereditário, principalmente quando pacientes jovens são acometidos.³⁵ Além disso, estaríamos excluindo os casos de

Tabela 1

Critérios de Bethesda para indicação de teste genético para instabilidade de microssatélites em pacientes portadores de tumores relacionados ao HNPCC.³⁸

1. Indivíduos com câncer que preenchem os critérios de Amsterdam.
2. Indivíduos com dois tumores relacionados ao HNPCC, incluindo CCR sincrônico e metacrônico, ou tumores extracolônicos (endométrio, ovário, estômago, hepatobiliar, intestino delgado, células transicionais de pelve renal e ureter).
3. Indivíduos portadores de CCR e um parente em primeiro grau com CCR e/ou tumores extracolônicos relacionados ao HNPCC e/ou adenomas colorretais. Um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos e os adenomas antes dos 40 anos de idade.
4. Indivíduos com CCR ou câncer de endométrio diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
5. Indivíduos com CCR em cólon direito com padrão histológico indiferenciado diagnosticado antes dos 45 anos de idade (padrão sólido/cribriforme *)
6. Indivíduos com CCR com padrão histológico em anel de sinete (mais de 50%) diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
7. Indivíduos com adenomas colorretais diagnosticados antes dos 40 anos de idade.

* Definido como pouco diferenciado ou indiferenciado: carcinoma composto por células eosinofílicas grandes, irregulares e sólidas, contendo pequenos espaços simulando glândulas.

tumores extracolônicos não previstos, por isso, novos critérios têm sido estudados.^{36,37} A tabela 1 demonstra em linhas gerais as características dos pacientes com maior risco de serem portadores de HNPCC, candidatos aos testes genéticos de diagnóstico molecular.³⁴

Famílias com forte evidência clínica de HNPCC, mas sem preenchimento completo dos critérios de Amsterdam, podem ter mutações germinativas encontradas em cerca de 60% das vezes.³⁸ Por outro lado, outros estudos demonstram que a taxa de positividade para mutações nos mesmos genes em famílias com fenótipo típico de HNPCC pode estar entre 25% e 50%.³⁹ Esses resultados controversos indicam a necessidade de maior conhecimento das causas genéticas da doença.

Atualmente, conhecemos os principais genes de reparo que, se mutados, predis põem ao HNPCC e suas respectivas localizações no genoma: gene *hMSH2* (human mutS homolog 2) – braço curto do cromossomo 2 (2p); gene *hMLH1* (human mutL homolog 1) – braço curto do cromossomo 3 (3p); gene *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1) – braço longo do cromossomo 2 (2q); gene *hPMS2* (human postmeiotic homolog 2) – braço curto do cromossomo 7 (7p). Além desses genes, recentemente foi descrito o gene *hMSH6/GTBP*, que também predis põe ao HNPCC, porém, ainda pouco estudado.^{20,34,40} Apesar da controvérsia nos números, parece que metade dos casos diagnosticados de HNPCC pode apresentar mutações no gene *hMSH2*, cerca de 30% no gene *hMLH1*, 5% no *hPMS1*

e 5% no *hPMS2*. A função desses genes é produzir proteínas que reconhecem e reparam o DNA após possíveis erros de replicação, por isso são chamados de genes de reparo (*mismatch repair genes*).

Os genes de reparo desempenham papel de extrema importância na célula, funcionando como verdadeiros controladores de qualidade, reconhecendo e reparando falhas, mantendo a fidelidade do DNA durante a replicação. Essas falhas podem ocorrer por pareamento incorreto das bases ou por deslizamento do enzima DNA polimerase na fita molde durante a divisão.²⁰

A figura 6 demonstra mutação no gene *hMSH2* diagnosticada em família registrada no Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, portadora de HNPCC, que preenche os critérios de Amsterdam. Houve deleção da base G no códon 417, exon 7, mudando a fase de leitura do DNA e levando a uma proteína truncada alguns nucleotídeos adiante. O heredograma da mesma família é demonstrado na figura 7.

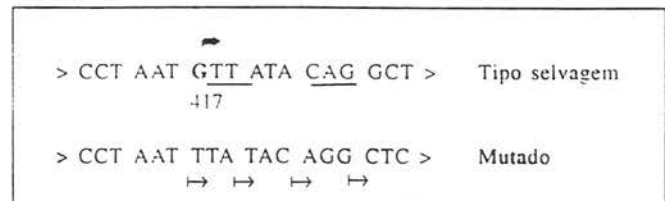


Figura 6 – Mutação diagnosticada no gene *hMSH2* em família portadora de HNPCC

O risco de um paciente do sexo masculino portador de mutação herdada predisponente ao HNPCC desenvolver CCR é de 74%, ao passo que as mulheres têm um risco menor, em torno de 30%, porém, com o risco de câncer de endométrio de cerca de 42%, o que reforça a necessidade de acompanhamento ginecológico.⁴¹ Estudos correlacionando o fenótipo com o genótipo de famílias portadoras de HNPCC indicam que mutações no gene *hMSH2* estão relacionadas com maior número de casos de câncer de endométrio associado ao CCR, enquanto mutações no gene *hMLH1* mais relacionadas ao CCR isolado.

Quando tecido tumoral de pacientes portadores de HNPCC é analisado, encontra-se instabilidade genética em seqüências repetitivas de bases no DNA, também chamadas de microssatélites, cuja função ainda é desconhecida. Essa instabilidade ocorre devido a deficiência dos genes de reparo, o que caracteriza esses tumores como positivos para erros de replicação, ou RER+, ou ainda fenótipo RER.⁴¹ Porém, entre 12% e 15% dos pacientes com CCR esporádico, sem história familiar, também podem apresentar testes positivos para RER não causados por mutações somáticas nos genes responsáveis pelo HNPCC, o que indica outro mecanismo de carcinogênese ainda desconhecido.⁴² São indivíduos geralmente jovens, quase sempre abaixo de 40 anos, e com melhor prognóstico de sobrevida quando comparados com aqueles sem fenótipo RER (68% versus 32% em cinco anos).⁴³

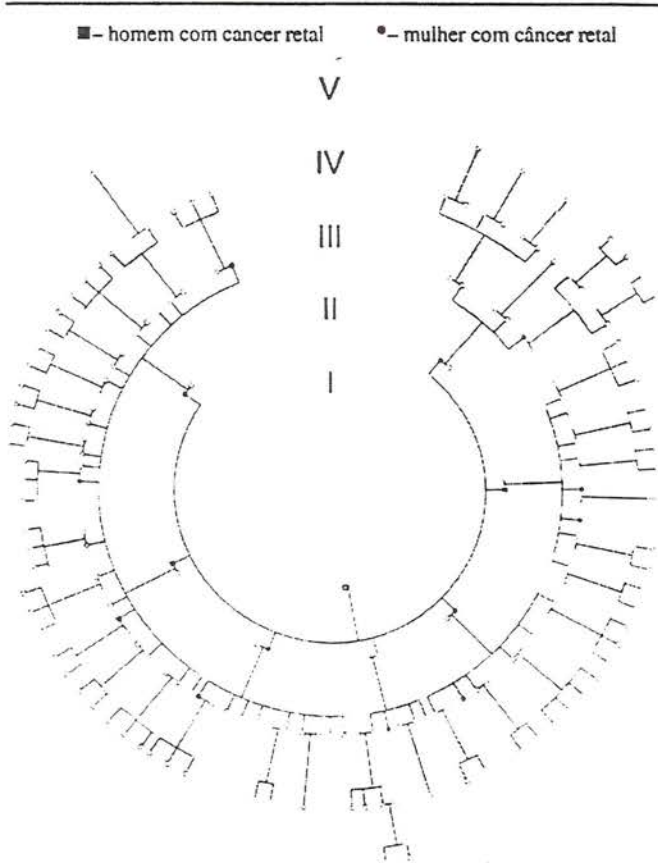


Figura 7 – Heredograma da mesma família portadora de HNPCC citada na figura 6

Os testes genéticos usados atualmente para identificação de HNPCC podem ser realizados por análise de IVSP/PTT, da mesma forma como na FAP, ou através de seqüenciamento direto dos quatro genes de reparo mais conhecidos já citados, responsáveis por cerca de 90% dos casos. Importante lembrar que, pelo mesmo motivo exposto para a FAP, o primeiro teste genético em uma família suspeita de HNPCC deve ser feito em um indivíduo portador de CCR.

Outra maneira de se realizar o teste genético é pesquisar o fenótipo RER no tecido tumoral de pacientes suspeitos de HNPCC, mesmo sabendo da possibilidade de resultado falso-positivo em cerca de 15% dos casos, como já comentamos. Nos casos RER+ existe a necessidade de confirmação do resultado do teste através de seqüenciamento direto dos genes de reparo e localização do defeito genético específico.²⁰

Tratamento do HNPCC

A indicação de tratamento no HNPCC é mais complexo do que na FAP, pois não existem as centenas de pólipos adenomatosos benignos que podem se desenvolver até por anos antes da transformação maligna, permitindo uma cirurgia planejada. O aparecimento do CCR em pacientes portadores de HNPCC pode advir de pólipos adenomatosos isolados ou de

carcinomas *de novo*, que, como já vimos, se comportam de forma agressiva.

Para podermos planejar a orientação de pacientes portadores de HNPCC antes do aparecimento do câncer, temos que dividir esses pacientes assintomáticos em três grupos: 1) sabidamente portadores de defeito genético herdado; 2) sabidamente não portadores de defeito genético herdado; 3) sem condições de realizar o teste genético de predisposição.

No primeiro grupo existe controvérsia na realização ou não de uma colectomia total profilática, com anastomose ileorretal, pois como a penetrância do gene que causa a doença está entre 80% e 90%, estaríamos operando um grupo de pacientes desnecessariamente. Além disso, apesar de pequena, existe a morbi/mortalidade do tratamento cirúrgico e a chance de aparecimento de tumores em outros órgãos já citados, inclusive no reto remanescente após colectomia total, que apresenta risco de câncer de 12% em 12 anos.⁴⁴

Como a mutação no HNPCC é herdada ou germinativa, o defeito genético está em todas as células do paciente e não haveria sentido em realizar ressecções múltiplas profiláticas de todos os órgãos alvo, baseando-se no provável fenótipo da doença, inclusive histerectomias.⁴⁵ Entretanto, a controvérsia sobre as cirurgias profiláticas existe, mas com uma tendência mundial em não realizá-las como procedimentos padrão em indivíduos assintomáticos portadores do defeito genético predisponente ao HNPCC. A conduta mais aceita é o seguimento rigoroso com colonoscopia anual ou bianual, iniciando-se com a idade de 25 anos, endoscopia digestiva alta e exames de imagem abdominal e pélvico (ultra-sonografia, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética). Ao nosso ver, atualmente, a melhor conduta é o esclarecimento total do paciente e de sua família sobre a doença e todos os riscos de aparecimento de câncer. Assim, uma decisão consciente do paciente em conjunto com o médico e a equipe multidisciplinar deve ser tomada. Alguns autores indicam rotineiramente a colectomia total, referindo tratar-se de um procedimento de baixa morbi/mortalidade, e, que, além de oferecer boa qualidade de vida aos indivíduos a ela submetidos, evitaria o aparecimento do CCR em cerca de 80% dos casos onde o gene teria sua penetrância ativa.⁴⁶

No segundo grupo de pacientes, não há controvérsia, pois como os indivíduos não são portadores do defeito genético, eles têm o mesmo risco da população em geral para desenvolver CCR. Assim sendo, seu seguimento deve ser feito somente em casos com sintomas clínicos específicos.

No terceiro grupo – dos indivíduos assintomáticos que não sabem se são ou não portadores de defeito genético herdado – não deve haver indicação de cirurgias profiláticas, mas sim de seguimento rigoroso com exames periódicos, como se todos fossem portadores do HNPCC (primeiro grupo). Esse seguimento é feito apesar de sabermos que metade dos indivíduos de uma mesma família não apresenta o defeito genético, de acordo com a herança mendeliana clássica para doença genética autossômica dominante, com um dos pais

heterozigoto. Por isso, sempre que possível, devemos realizar testes genéticos para identificar os portadores de mutações predisponentes ao HNPCC, pois estaríamos excluindo 50% dos casos do acompanhamento e dos exames, diminuindo expressivamente custos financeiros e não causando estresse emocional desnecessário.

Nos pacientes que já se apresentam com câncer no cólon, a cirurgia está indicada e deve ser a colectomia total com ileorreto anastomose, pois sabemos do risco aumentado de CCR sincrônico e metacrônico. Mesmo os pacientes submetidos à colectomia total devem realizar retoscopias anuais, devido ao risco elevado de câncer retal. No caso do tumor estar localizado primariamente no reto, existe controvérsia, mas a tendência é que a cirurgia indicada seja a mesma utilizada em pacientes com FAP e comprometimento retal, ou seja, a proctocolectomia total com bolsa ileal em "J" e anastomose coloanal através da técnica de duplo grampeamento, seguindo todos os princípios da cirurgia oncológica clássica.

Orientação genética

O estabelecimento de uma rotina de atendimento das famílias portadoras de CCR hereditário é muito importante, principalmente para a organização do registro, coleta de material biológico para os testes genéticos e acompanhamento através de tratamento multidisciplinar.⁴

Quando um paciente tem suspeita clínica de CCR hereditário, este deve ser orientado detalhadamente sobre sua doença. As decisões de conduta, tanto para a FAP como para o HNPCC, devem ser tomadas em conjunto com o paciente, que deve estar consciente do potencial de transmissão para os filhos, permitindo um planejamento familiar, e de acordo com todos os prós e contras dos métodos diagnósticos e terapêuticos propostos.

O teste genético deve ser muito bem esclarecido, principalmente com relação às suas limitações e sua confidencialidade, que deve ser absoluta, evitando-se assim estresse excessivo do paciente e possíveis problemas de discriminação das empresas de saúde ou de empregadores.

A coleta do material para estudo genético deve ser realizada preferencialmente em indivíduos maiores que 18 anos, com consentimento escrito informado e assinado pelo paciente ou responsável, onde devem estar relacionadas e explicadas

as condições em que o teste é realizado. Porém, existem relatos de testes realizados em menores de idade com consentimento dos pais, inclusive com ótimos resultados na esfera psicológica.²⁰

Nos Estados Unidos e Europa existem inúmeros serviços especializados no atendimento de famílias portadoras de tumores com caráter hereditário. Segundo relato do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI), em 1995 existiam 41 centros de atendimento para famílias com tumores hereditários no país.⁴⁷

Alguns modelos de atendimento são propostos por diferentes autores. Lynch et al.⁴⁸ propõem um modelo de avaliação genética para câncer hereditário, que inclui um questionário, apoio clínico, reunião de família e educação da família. Outra proposta recomenda história familiar completa, exame físico, exames de laboratório, teste psicológico, orientação genética e psicológica, além de um programa de suporte a longo prazo.⁴⁹ Mulvihill⁵⁰ afirma que o cuidado com famílias portadoras de tumores hereditários deve ser total, com orientação genética formal desde o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes, colocando os riscos da doença e sua transmissão para cada membro da família.

No Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em São Paulo, contamos com um serviço multidisciplinar de atendimento a pacientes e famílias de portadores de CCR hereditários, incluindo cirurgião, clínico, geneticista, psiquiatra, assistente social e biólogo molecular. Atualmente estão registradas 35 famílias portadoras de CCR hereditário, atendidas com suporte global desde o diagnóstico clínico até o molecular, passando pela orientação genética e psicológica.

Um ponto de extrema importância para a oncologia em geral é a disseminação de informações sobre o assunto, tanto para os médicos, desde a formação acadêmica, como para a população. Somente através da educação da população e da formação adequada de novas gerações de médicos é que mais diagnósticos de adenomas, de CCR precoces e de famílias portadoras de tumores hereditários, não apenas colorretais, serão realizados, com encaminhamento, então, para instituições de atendimento terciário ou especializado, dando início ao processo do tratamento ainda em fase adequada, evitando-se assim óbitos pela doença.

ABSTRACT

About 15% of the colorectal tumors are hereditary. There are two main groups: the familiar adenomatous polyposis (FAP) and the non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), both autosomal dominant diseases. Patients with FAP present hundreds to thousands of adenomas in colorectum, usually after puberty. The cause of FAP is mutation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene, located on long arm of chromosome 5 (5q). Patients who have not undergone to colectomy, the only treatment available, will develop colorectal cancer and die at the age of 45 years. Extracolonic manifestations can occur: gastric and small bowel adenomas, soft tissue tumors, retinal pigmentation, osteomas. Patients with HNPCC do not present hundreds of benign polyps, but already a solitary colorectal cancer. This disease is caused by mutations in one of the several mismatch repair genes (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hPMS6/GTBP). The average age of the diagnosis is 45 years and

usually the disease produces cancer in the right colon. Other carcinomas can occur: endometrial, stomach, pancreas and others. Prophylactic surgery in asymptomatic gene carriers are controversial. Nowadays it is possible to identify asymptomatic genes carriers of FAP and HNPCC by genetic testing. The analysis can be done by direct gene sequencing or by in vitro synthesized protein assay (IVSP), which finds defective truncate proteins. Genetic testing for hereditary forms of colorectal cancer requires not only an appropriate laboratory, but genetic counseling with an ethical multidisciplinary approach considering the psychological and social consequences.

Key Words: Familial adenomatous polyposis; FAP; Adenoma; Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC; Genetic tests.

REFERÊNCIAS

1. Fearon ER – Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In: Mendelsohn, Howley PM, Israel MA, Liotta LA – *The molecular basis of cancer*. Philadelphia W.B.Saunders, 1995. p.340-57.
2. Fearon ER, Vogelstein B – A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
3. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1996: Rio de Janeiro, Pro-Onco, 1996. p.19.
4. Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, et al – Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *South-American Journal of Cancer* 1997;1:191-7.
5. Menko FH – Familial and hereditary colorectal cancer. In: Menko FH (ed): *Genetics of colorectal cancer for clinical practice*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993, pp.58-112.
6. Distant S, Nasioulas S, Somers GR, et al – Familial adenomatous polyposis in a 5 year old child: a clinical, pathological, and molecular genetic study. *J Med Genet* 1996;33:157-60.
7. Bertoni G, Sassatelli R, Nigrisoli E, et al – High prevalence of adenomas and microadenomas of the duodenal papilla and periampullary region in patients with familial adenomatous polyposis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1.201-6.
8. Valanzano R, Cama A, Volpe R, et al – Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Cancer* 1996;78:2.400-10.
9. Clark SK, Phillips RK – Desmoids in familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1996;83:1.494-504.
10. Lynch HT, Fitzgibbons R Jr – Surgery, desmoid tumors, and adenomatous polyposis: case report and literature review. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2.598-601.
11. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG – Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 1997; 15: 2744-58.
12. Marchesa P, Fazio VW, Church JM, et al – Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 1.023-8.
13. Civitelli S, Tanzini G, Cetta F, et al – Papillary thyroid carcinoma in three siblings with familial adenomatous polyposis. *Int J Colorectal Dis* 1996; 11: 34-7.
14. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al – Mutations of chromosome 5q21 in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-9.
15. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, et al – Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1.982-7.
16. Knudson AG Jr – Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-43.
17. Powel SM, Zils N, Beazer-Barclay Y, et al – APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-7.
18. Erisman MD, Scott JK, Astrin SM – Evidence that the FAP gene is involved in a subset of colon cancers with a completable defect in c-myc regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 4.264-8.
19. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, et al – Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993;10:1.719-21.
20. Giardiello FM – Genetic testing in hereditary colorectal cancer. *JAMA* 1997;278:1.278-81.
21. Giardiello FM, Petersen GM, Piantadosi S, et al – APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis. *Gut* 1997;40:521-5.
22. Wu JS, Paul P, McGannon EA, et al – APC genotype, polyp number, and surgical options in familial adenomatous polyposis. *Ann Surg* 1998;227:57-62.
23. Milsom JW, Ludwig KA, Chuch JM, et al – Laparoscopic total abdominal colectomy with ileorectal anastomosis for familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1997;40:675-8.
24. Parks IG, Percy JP – Resection and sutured coloanal anastomosis for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1982; 69:301-4.
25. Korsgen S, Keighley MR – Causes of failure and life expectancy of the ileal pouch. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:4-8.
26. Ziv Y, Church JM, Oakley JR, et al – Results after restorative proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis and coexisting colorectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:1.578-80.
27. Richard CS, Berk T, Bapat BV, et al – Sulindac for periampullary polyps in FAP patients. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:14-8.
28. Belchetz LA, Berk T, Bapat BV, et al – Changing causes of mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996;39:384-7.
29. Lynch HT, Smyrk T – Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). An updated review. *Cancer* 1996;78:1.149-67.
30. Muto T, Bussey HJ, Morson BC – The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975;36:2.251-70.
31. Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR – Hereditary non-polyposis colorectal cancer: morphologies, genes and mutations. *Mutat Res* 1994;290:125-33.

32. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P – Screening reduces colorectal cancer rate in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Gastroenterology* 1995;108:1.405-11.
33. Fitzgibbons R, Lynch HT, Stanislav G, et al – Recognition and treatment of patients with hereditary non-polyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987;206:289-95.
34. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al – A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1.758-62.
35. Vieira RAC, Rossi BM, Lopes A, et al – Rastreamento do câncer color-retal. *Acta Oncol Bras* 1997;17:40-6.
36. Kuska B – New diagnostic criteria for HNPCC are on the way. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 11-2.
37. Ponz de Leon M, Percesepe A, Benatti P, et al – Familial and hereditary factors in colorectal cancer: a new classification of tumors of large bowel (meeting abstract). *Br J Cancer* 1996; 73: 22.
38. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, et al – Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997;84:233-7.
39. Weber TK, Conlon W, Petrelli NJ, et al – Genomic DNA-based *hMSH2* and *hMLH1* mutation screening in 32 Eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees. *Cancer Res* 1997;57:3.798-803.
40. Lynch HT – Is there a role for prophylactic total colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 1996;39:109-10.
41. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al – Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997;6:105-10.
42. Senba S, Konishi F, Okamoto T, et al – Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* 1998;82:279-85.
43. Lukish JR, Muro K, DeNobile J, et al – Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 1998;227:51-56.
44. Rodrigues-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, et al – Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 1997;225:202-7.
45. Soravia C, Bapat B, Cohen Z – Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC): a review of clinical, genetic and therapeutic aspects. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127:682-90.
46. Church JM, Fazio VW, Lavery IC, et al – Quality of life after prophylactic colectomy and ileorectal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996; 39:1.404-8.
47. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, et al – Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancers Centers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1.446-55.
48. Lynch HT, Fitzsimmons ML, Lynch J, Watson P – A hereditary cancer consultation clinic. *Nebr Med J* 1989;74:251-9.
49. Li FP, Garber JE, Friend SH, et al – Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1.156-60.
50. Mulvihill JJ – Genetic counseling of the cancer patient. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. Vol 2, 4th ed., Philadelphia: Lippincott, 1993. p.2529-37.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dr. Benedito Mauro Rossi
Hospital A. C. Camargo
Depto. Cirurgia Pélvica
Rua Prof. Antônio Prudente, 211
01509-010 – São Paulo – SP

3. Conclusões

- 3.1 A taxa de detecção de mutações, encontrada nas famílias suspeitas de HNPCC que participaram deste estudo foi de 10/25 ou 40%;
- 3.2 A taxa de detecção de mutações foi maior no gene *hMLH1* (8/25 ou 32%) em relação ao gene *hMSH2* (2/25 ou 8%);
- 3.3 Das nove diferentes mutações detectadas, sete ainda não haviam sido descritas na literatura (7/9 ou 77,8%);
- 3.4 Apenas 30% das famílias com mutações detectadas preenchem os Critérios de Amsterdam para diagnóstico clínico de HNPCC;
- 3.5 A suspeita clínica de HNPCC, baseada nos Critérios de Bethesda, é fundamental, devendo ser indicativa para testes moleculares de rastreamento da doença.