

**CARACTERIZAÇÃO DE MUTAÇÕES POR MEIO
DE SEQUENCIAMENTO DOS GENES *hMLH1* E
hMSH2 EM PACIENTES COM SUSPEITA DE
SÍNDROME DE LYNCH**

MEV DOMINGUEZ VALENTIN

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi

Co-orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

São Paulo

2009

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Dominguez, Mev Valentin

Caracterização de mutações por meio de sequenciamento dos genes *hMLH1* e *hMSH2* em pacientes com suspeita de Síndrome de Lynch / Mev Dominguez Valentin – São Paulo, 2009.

118p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Benedito Mauro Rossi

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

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Constantino e Maxi, pelo incondicional amor, apoio e exemplo que me transmitem durante minha vida. Vocês são a base de meus princípios e conquistas.

Aos meus irmãos, Ivonne, Michael e Yanina pelo carinho, apoio e força constante.

Aos meus adorados e queridos sobrinhos, Sebastian, Damaris, Rodrigo, Mathias, Nestor e Fabio pela alegria, pureza e vivacidade que alegram e colorem meu viver.

AGRADECIMENTOS

À Deus, por me permitir esta experiência de vida.

Ao Dr. Benedito Mauro Rossi, pelo grande apoio e incentivo que me deu em realizar este trabalho e pelo exemplo como profissional e ser humano.

À Dra. Dirce Maria Carraro pela dedicação e apoio profissional nos momentos que mais precisei.

À Dra. Erika Maria Monteiro, pelo suporte profissional.

À Ana Maria, Luciana pela paciência e boa vontade em me ajudar em tudo que precisei.

Ao Conselho de Pós Graduação, pelo auxílio financeiro.

Aos membros da banca pela aceitação e cordial disponibilidade para colaborar com o trabalho.

Ao pessoal do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular, pelo companheirismo e momentos de descontração no laboratório, tornando minha jornada mais leve.

À meus eternos amigos Ellenzinha, Sabrina, Maria Cristina, Nadia, Mariana, Thiaguinho e Aderbalzinho pela grande amizade, momentos de alegria e apoio desde meu primeiro dia no laboratório de Genômica e Biologia Molecular.

À minha querida amiga Adriana, pela amizade durante esses anos.

Ao meu querido amigo Alexandre, pela amizade sincera, e apoio nos momentos que mais precisei.

À minha querida amiga, cúmplice, irmã Hellen Marra pela ótima convivência dentro e fora de casa.

À minha amiga Maria Helena pelo apoio constante desde a adaptação a nova cidade, amizade sincera e peruana.

À Susan, mais que uma amiga, uma irmã que tem me apoiado desde longe e sempre esteve e estará presente no meu coração.

À minha Mami Sofia, pelo exemplo de vida e sábios conselhos.

Aos pacientes por terem permitido a realização deste trabalho.

RESUMO

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

Introdução - A Síndrome de Lynch (SL) tem padrão de herança autossômico dominante com alta penetrância (aproximadamente 70%- 80%). Predis põe ao desenvolvimento precoce de câncer colorretal (CCR), endométrio, ovário, intestino delgado, estômago e trato urinário. Os antecedentes familiares de câncer podem identificar indivíduos e famílias sob risco. Os principais critérios clínicos utilizados para a suspeita diagnóstica são os de Amsterdam e de Bethesda. Os genes de reparo de DNA, *MSH2* e *MLH1* são responsáveis por mais de 85% das mutações germinativas conhecidas em pacientes portadores de SL. **Objetivos** - O objetivo geral deste trabalho foi a pesquisa de mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* em indivíduos com suspeita clínica de SL. **Casuística e Métodos** – Foram estudados 99 pacientes não relacionados, portadores de CCR com os principais critérios clínicos para suspeita de SL. Os DNAs dos pacientes foram obtidos a partir de sangue periférico e submetidos a PCR para análise de todos os exons e regiões intron-exons dos genes. Foram então submetidos a sequenciamento direto em ambos os sentidos. **Resultados** – Foram encontradas 32 (30%) mutações patogênicas nos genes *MLH1* ou *MSH2*, sendo 21/41 (51,2%) dos pacientes com critérios de Amsterdam e 9/58 (15,5%) dos pacientes com critérios de Bethesda. Foram descritas pela primeira vez 13 mutações patogênicas nos genes *MLH1* ou *MSH2*. **Conclusão** – Nossos resultados foram concordantes com os encontrados na literatura tanto na porcentagem de mutações encontradas, como na proporção em cada um dos genes de reparo estudados. Além disso, observamos maior especificidade dos critérios de Amsterdam na

detecção de indivíduos portadores da mutação germinativa. O sequenciamento automático é uma metodologia eficaz na detecção de alterações pontuais e de pequenas deleções, inserções e duplicações.

SUMMARY

Dominguez MV. [**Characterization of mutations by sequencing of *hMLH1* and *hMSH2* in suspected Lynch syndrome patients**]. São Paulo; 2009. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction – Lynch syndrome (LS) presents an autosomal dominant inheritance pattern with a high penetrance (approximately 70% - 80%). LS predisposes to early development of colorectal cancer (CRC), endometrium, ovary, small intestine, stomach and urinary tract. Family history of cancer could identify individuals and families at risk. The main clinical criteria for diagnosis are Amsterdam and Bethesda Criteria. The mismatch repair genes, *MSH2* and *MLH1* are responsible for more than 85% of known germline mutations in patients with SL. **Objectives** – To study germline mutations in *MLH1* and *MSH2* genes in patients with clinically suspected SL. **Material and Methods** – Here, described 99 unrelated patients suffering of CRC with the major clinical criteria for suspicion of SL. The DNAs of the patients were obtained from peripheral blood and subjected to PCR for analysis of all exons and intron-exon regions of genes. Then, they were directed sequenced in both directions. **Results** - We found 32 (30.4%) pathogenic mutations in *MLH1* or *MSH2* genes, and among them, 21/41 (51.27%) of patients with Amsterdam criteria and 9/58 (15.5%) of patients with Bethesda criteria. We described, for the first time, 13 pathogenic mutations in *MLH1* or *MSH2* genes. **Conclusions** - Our results were consistent with literature in the percentage of mutations found, as well as in the proportion of each mismatch repair genes studied. Moreover, we observed a higher specificity of the Amsterdam criteria for the detection of individuals carrying the germline mutation. The automated sequencing is an effective methodology for detection of substitutions, small deletions, insertions and duplications.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Neoplasias mais incidentes, estimadas para o ano 2008 na população brasileira, não considerando tumores de pele não melanoma.....	2
Figura 2	Componentes genéticos e ambientais na carcinogênese do CCR.....	4
Figura 3	Tipos de mutações no gene <i>MLH1</i>	16
Figura 4	Frequência das variantes germinativas reportadas para o gene <i>MLH1</i> segundo a literatura.....	17
Figura 5	Tipos de mutações no gene <i>MSH2</i>	18
Figura 6	Frequência das variantes germinativas reportadas para o gene <i>MSH2</i> segundo a literatura.....	19
Figura 7	Modelo do sistema de reparo de DNA nas células eucariotas.....	21
Figura 8	Modelo proposto para as análises das variantes nos genes de MMR em pacientes com suspeita de SL.....	28
Figura 9	Perfil da quantificação de DNA mediante NanoDrop ND 1000, mostrando uma alta quantidade e pureza de DNA.....	37
Figura 10	Diagrama representativo da localização dos fragmentos amplificados com os iniciadores para os exons do gene <i>MLH1</i>	39

Figura 11	Fotografia do gel de agarose 0,8%, onde. M= marcador de peso molecular (1Kb) e Linha 1= DNA genômico do paciente SL-1D.....	49
Figura 12	Frequência dos tipos de alterações no gene <i>MLH1</i>	52
Figura 13	Frequência dos exons afetados no gene <i>MLH1</i>	53
Figura 14	Representação do polimorfismo no c.655(A->G) ou I219V no exon 8 do gene <i>MLH1</i>	64
Figura 15	Frequência dos tipos de alterações no gene <i>MSH2</i>	66
Figura 16	Frequência dos exons afetados no gene <i>MSH2</i>	67
Figura 17	Representação do polimorfismo no c.1661+12(G->A) no intron 10 do gene <i>MSH2</i>	73
Figura 18	Representação do polimorfismo no c.2006-6(T->C) no intron 12 do gene <i>MSH2</i>	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Estabelecimento de Risco de Câncer.....	30
Tabela 2	Protocolo Atual de Vigilância na Holanda para Portadores de Mutação nos genes de MMR.....	31
Tabela 3	Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.....	41
Tabela 4	Programas definidos para cada par de iniciadores dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	42
Tabela 5	Distribuição dos pacientes selecionados de acordo ao critério clínico utilizado.....	46
Tabela 6	Tumores diagnosticados, número de pacientes afetados, idade média e variação da idade ao diagnóstico nos pacientes estudados.....	47
Tabela 7	Classificação dos tumores dos pacientes incluídos no estudo quanto à localização e ao seu estadiamento patológico.....	48
Tabela 8	Sequências nucleotídicas dos 40 iniciadores para os genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> e sua localização no gene e o tamanho de cada fragmento amplificado.....	51
Tabela 9	Descrição da posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, SIFT e <i>Polyphen</i> e no presente trabalho das alterações encontradas no gene <i>MLH1</i>	55

Tabela 10	Caracterização e representação das mutações patogênicas do gene <i>MLH1</i>	58
Tabela 11	Predição da patogenicidade mediante os programas <i>in silico</i> , <i>Polyphen</i> e SIFT.....	62
Tabela 12	Representação das mutações patogênicas caracterizadas pelo <i>Polyphen</i> e SIFT no gene <i>MLH1</i>	63
Tabela 13	Frequência do polimorfismo I219V em pacientes com suspeita de SL.....	65
Tabela 14	Descrição da posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, SIFT e <i>Polyphen</i> e no presente trabalho das alterações encontradas no gene <i>MSH2</i>	68
Tabela 15	Caracterização e representação das mutações patogênicas do gene <i>MSH2</i>	69
Tabela 16	Predição da patogenicidade mediante os programas <i>in silico</i> , <i>Polyphen</i> e SIFT.....	72
Tabela 17	Representação da mutação no gene <i>MSH2</i> caracterizada pelo <i>Polyphen</i> e SIFT.....	73
Tabela 18	Frequências dos polimorfismos c.1661+12(G->A) e c.2006-6(T->C) no gene <i>MSH2</i> em pacientes com suspeita de SL...	75
Tabela 19	Representação dos pacientes com alteração nos dois genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , caracterização patogênica das alterações e do critério clínico.....	76

Tabela 20	Correlação entre as mutações patogênicas dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> e os critérios clínicos nos pacientes com suspeita de SL.....	77
Tabela 21	Comparação entre as análises de MSI, IHQ e Sequenciamento dos pacientes com suspeita de SL.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

3'UTR	<i>three prime untranslated region</i>
5'UTR	<i>Five prime untranslated region</i>
AA	aminoácido
CCR	Câncer colorretal
DNA	ácido desoxirribonucléico
EXO1	<i>exonuclease 1</i>
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
IHQ	imunoistoquímica
InSIGHT	<i>International Society of Hereditary Gastrointestinal Cancer</i>
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i>
LOVD	<i>Leiden Open Source Variation</i>
MLH1	<i>mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2</i>
MLH3	<i>mutL homolog 3</i>
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	<i>mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1</i>
MSH3	<i>mutS homolog 3</i>
MSH6	<i>MSH6 mutS homolog 6</i>
MSI	instabilidade de microssatélites
MSI-H	instabilidade de microssatélites alta
MSI-L	instabilidade de microssatélites baixa
MSS	microssatellite estável
MutS, MutL	<i>methyl-directed mismatch repair protein</i>
PMS1	<i>PMS1 postmeiotic segregation increased 1</i>
PMS2	<i>PMS2 postmeiotic segregation increased 2</i>
Polyphen	<i>Polymorphism Phenotyping</i>
RCCR	Registro de Câncer Colorretal
RER	erro de replicação

RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
SIFT	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SL	Síndrome de Lynch
SNC	Sistema Nervoso Central
UVs	<i>Unclassified variant</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer colorretal	1
1.2	Câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) ou Síndrome Lynch (SL)	4
1.2.1	Diagnóstico Clínico da SL	5
1.2.2	Risco de desenvolvimento da SL	8
1.2.3	Características Anatomopatológicas dos tumores da SL	9
1.2.4	Genética Molecular da SL	10
1.2.5	Genes de Reparo de DNA, <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	14
1.2.6	Sistema de Reparo do DNA	20
1.2.7	Mutações associadas a SL	22
1.2.8	Estudos Funcionais das proteínas codificadas pelos genes de MMR	25
1.2.9	Estabelecimento de um modelo para análise das variantes nos genes MMR	28
1.2.10	Manejo e Vigilância de Pacientes SL	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	Objetivo principal	33
2.2	Objetivos Específicos	33
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	34
3.1	Casuística	34
3.1.1	Caracterização e Critérios de Inclusão dos Pacientes	34
3.1.2	Coleta de Dados	34
3.2	Métodos	35
3.2.1	Coleta das Amostras de Sangue Periférico	35
3.2.2	Separação dos Leucócitos	35
3.2.3	Purificação de DNA	36

3.2.4	Quantificação e Qualidade de DNA Genômico	37
3.2.5	Amplificação das Sequências de DNA	38
3.2.6	Detecção de Mutações por Sequenciamento Direto	40
3.3	Análise de resultados	43
3.3.1	Características Clínicas dos Pacientes	43
3.3.2	Descrição das Mutações Encontradas	43
3.3.3	Interpretação das Mutações Descritas	43
3.3.4	Interpretação das Mutações Não Descritas	44
3.4	Questões Éticas	45
4	RESULTADOS	46
4.1	Caracterização Clínica dos Pacientes	46
4.2	Caracterização das amostras estudadas	49
4.3	Estabelecimento das reações de PCR dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> por sequenciamento direto	49
4.4	Rastreamento de mutações por sequenciamento direto no gene <i>MLH1</i>	52
4.4.1	Frequência dos tipos de alteração	52
4.4.2	Frequência dos exons alterados	53
4.4.3	Interpretação das mutações do gene <i>MLH1</i>	53
4.4.4	Descrição de um polimorfismo frequente no exon 8 do gene <i>MLH1</i>	64
4.5	Rastreamento de mutações por sequenciamento direto no gene <i>MSH2</i>	65
4.5.1	Frequência dos tipos de alteração no gene <i>MSH2</i>	65
4.5.2	Frequência dos exons alterados no gene <i>MSH2</i>	66
4.5.3	Interpretação das mutações do gene <i>MSH2</i>	67
4.5.4	Descrição de dois polimorfismos frequentes no gene <i>MSH2</i>	73
4.6	Identificação de alterações nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> no mesmo paciente	75
4.7	Correlação entre as mutações patogênicas encontradas nos Genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> e o os critérios clínicos de Amsterdam	

	I/II Bethesda	76
4.8	Comparação das análises de MSI, IHQ com o sequenciamento Dos genes <i>MLH1</i> E <i>MSH2</i>	78
5	DISCUSSÃO	80
5.1	Caracterização das alterações nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	80
5.2	Interpretação das mutações no gene <i>MLH1</i>	83
5.3	Interpretação das mutações no gene <i>MSH2</i>	87
5.4	Identificação de duas alterações nos genes <i>MLH1</i> ou <i>MSH2</i> e no mesmo paciente	91
5.5	Interpretação da patogenicidade das alterações nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	92
5.6	Correlação entre as mutações patogênicas encontradas nos Genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> e o os critérios clínicos de Amsterdam I/II e Bethesda	95
5.7	Comparação das análises de MSI, IHQ com o sequenciamento Dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	97
6	CONCLUSÕES	101
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	102

ANEXOS

Anexo 1 Método para precipitação da reação de sequenciamento
por Etanol/EDTA.

Anexo 2 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 3 Quantificação e Qualidade dos DNAs estudados

Anexo 4 Artigo publicado

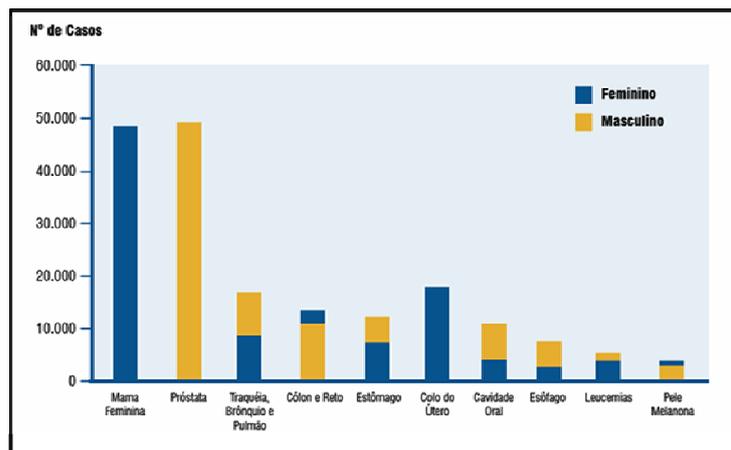
1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) tem uma incidência mundial anual de aproximadamente 950.000 casos. A taxa de incidência aumenta com a idade (MITCHELL et al. 2002).

A incidência do CCR em países desenvolvidos é cerca de quatro vezes maior do que em países em desenvolvimento. Existem fortes evidências de que essas variações podem ser devido aos fatores ambientais (MITCHELL et al. 2002).

No Brasil, o número estimado de casos novos de CCR no ano de 2008 foi de 12.490 entre homens e de 14.500 entre mulheres. A taxa de incidência é de 13 casos novos para 100 mil homens e de 15 para cada 100 mil mulheres (Ministério da Saúde 2007) (Figura 1). Sem considerar os tumores de pele não melanoma, na região Sudeste do Brasil o CCR é o terceiro mais frequente em homens (19/100.000) e o segundo em mulheres (21/100.000) (Ministério da Saúde 2007).



Fonte: Ministério da Saúde (2007)

Figura 1 - Neoplasias mais incidentes, estimadas para o ano 2008 na população brasileira, não considerando tumores de pele não melanoma.

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento de CCR são: antecedentes familiares de CCR, idade acima de 50 anos e hábitos alimentares específicos (DUARTE-FRANCO e FRANCO 2004).

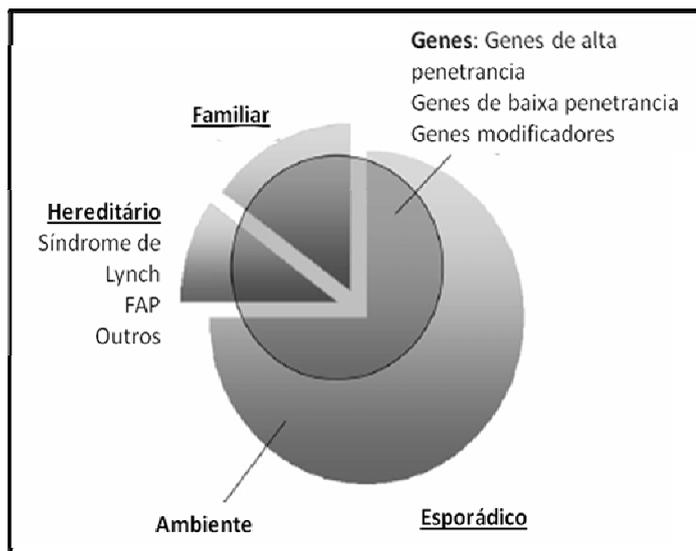
Nos últimos anos, a incidência de CCR tem aumentado em áreas antes consideradas de baixo risco. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e a um aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis (DUARTE-FRANCO e FRANCO 2004).

Segundo a história familiar, o CCR pode ser classificado em esporádico, familiar e hereditário.

O CCR esporádico corresponde a aproximadamente 75% a 80% dos CCRs, em que os principais fatores de risco são ambientais ou exógenos, apresentando-se como casos isolados na família e em idade avançada (ROCHA et al. 2005). No grupo de CCR familiar pesam fatores ambientais e fatores genéticos múltiplos, podendo ser causados por genes de baixa

penetrância, ou modificadores de risco (DE LA CHAPELLE 2004; MECKLIN 2008) (Figura 2).

As síndromes familiares típicas são responsáveis por cerca de 6% dos casos de CCR (FEARNHEAD et al. 2002). As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são: a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), responsável por menos de 1% dos casos, e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC – do inglês *Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*), ou Síndrome de Lynch (SL), responsável por cerca de 5% dos casos (LYNCH et al. 2005, MECKLIN 2008). Atualmente, o termo câncer colorretal hereditário sem polipose, ou HNPCC, tem sido menos utilizado para designar a clássica síndrome autossômica dominante de predisposição ao câncer (JASS 2006). Como a predisposição ocorre para tumores de diferentes sítios primários, e não somente para CCR, a denominação SL é menos restritiva. Tem sido utilizada para identificar famílias com pacientes portadores de CCR e tumores extracolônicos, desde que preencham critérios clínicos pré-estabelecidos (BOLAND 2005; DESAI et al. 2000).



Legenda: Os genes (alta e baixa penetrância e genes modificadores) e o ambiente influenciam o desenvolvimento dos três tipos de CCR (esporádico, familiar e hereditário). O tamanho das pizzas está baseado no conhecimento atual, podendo mudar conforme aquisição de mais dados sobre o fundamento molecular e genético do CCR.

Fonte: Mecklin et al. (2008)

Figura 2 - Componentes genéticos e ambientais na carcinogênese do CCR.

1.2 CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE (HNPCC) OU SÍNDROME LYNCH (SL)

A SL é a forma mais comum de CCR hereditário. Trata-se de uma síndrome autossômica dominante com uma alta penetrância (aproximadamente 70% - 80%) que predispõe ao desenvolvimento precoce de câncer de cólon, reto, endométrio, ovário, intestino delgado, estômago e trato urinário. Uma vez que não existem sinais premonitórios de suscetibilidade à SL, a história familiar é o método primário para identificar pacientes de alto risco (CHIALINA et al. 2006).

A proporção de CCR atribuída à SL está entre 1% e 3% e se o risco cumulativo de CCR é de 5%, a incidência proporcional da SL está entre

1:20.000 e 1:660, o que a torna uma das condições hereditárias mais comuns (DE LA CHAPELLE 2005). O reconhecimento desta síndrome é de grande importância na área clínica, uma vez que a identificação de indivíduos e do risco permite sua inclusão em programas de prevenção secundária com redução da morbi-mortalidade imposta pela síndrome (CUTAIT et al. 2005).

1.2.1 Diagnóstico Clínico da SL

A definição da SL pode ser considerada sob dois aspectos: o diagnóstico clínico e o diagnóstico molecular. A tendência é denominar como SL apenas os casos com mutação germinativa identificada nos genes de reparo (BOLAND 2005).

Os critérios diagnósticos para a SL são controversos, devido a variações fenotípicas (WANG et al. 2007). O diagnóstico clínico tem como base os antecedentes familiares de câncer, de acordo com os critérios de Amsterdam, e a suspeita clínica, de acordo com os critérios de Bethesda (VASEN e BOLAND 2005).

Os critérios de Amsterdam foram publicados em 1991. Considera-se que uma família possui a SL quando preenche todos os critérios abaixo relacionados (VASEN et al. 1991):

- Pelo menos três membros da família com CCR;
- Um dos membros parente em primeiro grau dos outros dois;
- Pelo menos duas gerações sucessivas acometidas;
- Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;

- Exclusão da FAP.

Em razão da observação de tumores extracolônicos associados à SL, os critérios de Amsterdam foram ampliados em 1999. Os novos critérios de Amsterdam, ou Amsterdam II, consideram, além do CCR, o adenocarcinoma de endométrio, adenocarcinoma de intestino delgado e o carcinoma de células transicionais de vias excretoras urinárias, como critérios para o diagnóstico da SL (VASEN et al. 1999).

O uso dos critérios de Amsterdam alcançou o seu propósito original de identificar famílias com SL, mas a sua baixa sensibilidade restringe demais o número de pacientes que deveriam ser avaliados através de testes moleculares (UMAR et al. 2004a).

Era preciso melhorar a sensibilidade do rastreamento de pacientes suspeitos de SL. Por isso, foram propostas algumas recomendações, conhecidas como critérios de Bethesda, mais sensíveis e menos restritivos que os critérios de Amsterdam. O objetivo não era fazer o diagnóstico clínico, mas sim identificar indivíduos candidatos aos testes genéticos de rastreamento, ou seja, pesquisar a instabilidade de microssatélites (MSI) (BOLAND et al. 1998).

Os critérios Bethesda foram propostos em 1996 (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997). Em 2002 os critérios foram revistos para serem mais abrangentes (UMAR et al. 2004a). Os indivíduos devem ser submetidos à pesquisa de MSI e/ou imunoistoquímica (IHQ), se preencherem um dos seguintes critérios (UMAR et al. 2004b):

- CCR diagnosticado em paciente com menos de 50 anos;
- Presença de CCR sincrônico, metacrônico, ou outro tumor associado ao espectro da SL, independentemente da idade;
- CCR com infiltração linfocitária, reação linfocitária tipo Crohn, diferenciação mucinosa/anel de sinete ou padrão medular de crescimento em indivíduo com menos de 60 anos de idade;
- CCR diagnosticado em dois ou mais parentes de primeiro ou segundo grau, com tumor relacionado ao espectro da SL, independentemente da idade.

O surgimento de novos casos de câncer na família, ou de informações suplementares, pode levar a uma reclassificação dentro dos critérios estabelecidos, caracterizando, muitas vezes, uma síndrome típica. Em outras situações, a despeito da falta de critérios clínicos para a determinação de hereditariedade, a investigação molecular pode definir o diagnóstico de síndrome hereditária. Por essas razões, mesmo na ausência de caracterização clínica típica, critérios objetivos devem ser utilizados para direcionar a investigação de hereditariedade.

O constante progresso observado na caracterização clínica e molecular da SL leva a uma interpretação dinâmica dos fatos. Pode-se antever a possibilidade de reformulações nos critérios utilizados para o rastreamento e o diagnóstico. Nesse sentido, definir o espectro de tumores extracolônicos como algo imutável certamente levaria a erros de interpretação. A frequente descoberta de novos achados moleculares tem

sido de suma importância para definição mais precisa da correlação genótipo-fenótipo e, conseqüentemente, para o esclarecimento do correto espectro de tumores extracolônicos na SL (GYLLING et al. 2007).

Nos anos 80, diferentes sítios primários foram descritos em famílias com suposto diagnóstico de SL: endométrio, ovário, sistema nervoso central (SNC), trato hepato-biliar, intestino delgado, trato urológico, mama (LYNCH et al. 1988a, LYNCH et al. 1990), estômago (CRISTOFARO et al. 1987), pâncreas (LYNCH et al. 1985), e sistema linfático e hematopoiético (LOVE et al. 1985). Diversas publicações sobre o assunto foram feitas, nas quais os cânceres mais comuns descritos como associados à SL eram endométrio, estômago e trato urinário (MECKLIN et al. 1986, BENATTI et al. 1993, LYNCH et al. 2009a).

A síndrome de Muir-Torre se caracteriza pela presença de neoplasia nas glândulas sebáceas e alguns tumores da pele, e está associada com neoplasias do mesmo espectro tumoral da SL (MECKLIN 2008).

1.2.2 Risco de desenvolvimento da SL

Os portadores de SL possuem risco aumentado de desenvolver CCR (60% a 70%, aos 70 anos), carcinoma endometrial (30% a 40%, aos 70 anos) e, um risco menor de desenvolver carcinomas de intestino delgado, de células transicionais do trato urinário superior, câncer de ovário, câncer de estômago, tumores cerebrais (Síndrome de Turcot), e tumores de glândulas sebáceas (Síndrome de Muir-Torre) (HENDRIKS et al. 2006a, LYNCH et al. 2009b).

O risco cumulativo de ocorrência de diferentes tumores relacionados à SL é apresentado em alguns estudos: 78% para CRC; 40% a 60% para endométrio; 19% para gástrico; 17,5% para trato biliar; 10% para trato urinário; e, 10% a 12% para ovário. O risco de qualquer tumor metacrônico pode chegar a 90% após o tratamento do CCR, e 75% após o tratamento de câncer de endométrio. O segundo tumor primário mais frequente em um mesmo indivíduo é o CCR ou o câncer de endométrio (AARNIO et al. 1995; AARNIO et al. 1999; LYNCH et al. 2009b).

1.2.3 Características Anatomopatológicas dos tumores da SL

Estudos realizados por LYNCH et al. (1988b) demonstram que pacientes com SL apresentam um grande número de carcinomas do tipo mucinoso (40%) e pobremente diferenciado em relação aos casos esporádicos (20%).

Em relação ao padrão histológico, os carcinomas de pacientes com SL se caracterizam por apresentar um padrão de crescimento sólido (células em forma de anel) e uma infiltração linfocítica localizada, explicando a alta frequência de tumores pobremente diferenciados nestes pacientes (KOURAKLIS e MISIAKOS 2003; KURNAT-THOMA 2008).

Quando comparamos CCR na SL com CCR esporádico, notamos predileção para acometimento do cólon direito (68% vs. 49%), maior incidência de CCR sincrônico (7% vs. 1%), maior incidência de CCR metacrônico em 10 anos (29% vs. 5%), e manifestação mais precoce da doença, geralmente entre 40 e 45 anos de idade (FITZGIBBONS et al.

1987). O aparecimento de tumores extracolônicos em outros membros da mesma família também pode indicar a presença da doença.

Os adenomas apresentam a mesma prevalência em pacientes SL como na população geral, mas eles aparecem numa idade mais precoce, e uma vez formados, eles evoluem para carcinoma de forma mais rápida e frequente em relação às lesões esporádicas (JASS et al. 1994, JÄRVINEN et al. 1995).

Um pequeno adenoma no intestino delgado pode progredir para carcinoma em 2-3 anos, enquanto que nos casos esporádicos demoraria de 8 a 10 anos. A razão adenoma-carcinoma nesses indivíduos é de praticamente 1:1, enquanto a estimativa equivalente para a população em geral é de 30:1. Isso ocorre devido a uma acelerada transição adenoma-carcinoma (JASS et al. 2002; FISHEL et al. 2001). Nos casos hereditários, os adenomas em pacientes SL apresentam uma displasia do tipo mais severa, com característica vilosa em relação aos casos esporádicos (KURNAT-THOMA 2008).

1.2.4 Genética Molecular da SL

A era da genética molecular na SL teve início nos anos 90, quando PELTOMÄKI et al. (1993) identificaram um *locus* no cromossomo 2p, por meio de análise de ligação, como sítio para um gene de predisposição para a SL. Depois de um ano, um segundo *locus* no cromossomo 3p foi identificado por LINDBLOM et al. (1993). Nessa época, demonstrou-se também que tumores de pacientes com SL apresentavam uma mudança

molecular característica, chamada de fenótipo de erro de replicação (RER), hoje conhecido como MSI. O reconhecimento de que a MSI é consequência de defeito no sistema de reparo de erros de replicação do DNA levou à descoberta, nos *loci* 2p22 e 3p22, dos genes *MSH2* e *MLH1*, considerados os principais responsáveis pela SL. Os dois genes respondem por aproximadamente 85% a 90% das mutações conhecidas, associadas à síndrome (GOECKE et al. 2006; PELTOMÄKI 2005), com uma penetrância de aproximadamente de 80%.

Posteriormente, foram identificados os seguintes *loci*: 2q31-33, correspondente ao gene *PMS1*; 7p22, correspondente ao gene *PMS2*; e 2p16, correspondente ao gene *MSH6* (PALOMBO et al. 1995, DRUMMOND et al. 1995). Alterações nos genes *MLH3* e *EXO1* ainda não têm sua relevância esclarecida (LAGERSTEDT et al. 2007; BACKES et al. 2009). A frequência de mutações em *MSH6* tem variado de acordo com a população estudada e o número de pacientes analisados, variam de 6% a 16% (DOVRAT et al. 2005).

Mutações no sistema de reparo causam frequentes alterações nos tratos poliólígo ou em sequências repetitivas de bases, espalhadas pelo genoma, também conhecidas como microssatélites. Cerca de 90% dos indivíduos portadores de CCR e SL apresentam MSI no tecido tumoral (DE LA CHAPELLE 2005).

Dentre as regiões não codificadoras do genoma, cerca de 3% são compostas por sequências repetitivas, randomicamente distribuídas. Estas sequências são divididas em repetições dispersas ou satélites, sendo assim

chamadas devido ao aparecimento, na espectrometria ótica, de uma banda “anexa”, ou “satélite”, junto à banda principal (BAUDHUIN et al. 2005). Os satélites são classificados de acordo com a extensão da sequência repetitiva de DNA.

Os microssatélites pertencem a uma abundante classe de sequências repetitivas intergênicas do genoma eucariótico e contém repetições de motivos de 1 a 5 pares de bases, podendo chegar a ter até 200 pares de base de extensão total (ALBERTS et al. 1999). São chamadas de microssatélites mononucleotídeos as repetições de uma mesma base, de dinucleotídeos as repetições de duas bases, e assim por diante, até o agrupamento de seis bases. Em relação à frequência, a repetição dinucleotídica CA é a mais comum, totalizando 0,5% do genoma. As repetições mononucleotídicas A e T representam 0,3% e as repetições dinucleotídicas GT ou AG representam 0,2%. Apesar de serem altamente polimórficos nas populações humanas, os microssatélites permanecem estáveis durante toda a vida de um indivíduo (SAKURAI et al. 2007).

Os microssatélites são, particularmente, propensos a deslizamentos das DNA polimerases, por desalinhamento da dupla fita, durante a replicação, resultando, frequentemente, em desalinhamentos das fitas de DNA. Se não forem reparados, estes erros fixam-se como mutações, por meio de inserções ou deleções de uma ou mais repetições durante as replicações subsequentes (IMAI e YAMAMOTO 2008).

A classificação de MSI é feita de acordo com a frequência de alterações de marcadores selecionados, sendo considerados estáveis

quando nenhum deles apresentar-se alterado (MSS). A classificação do nível de instabilidade se dá pela frequência, sendo considerada alta (MSI-H) quando mais de 30% dos marcadores estiverem alterada, e baixa (MSI-L) quando menos de 30% dos marcadores estiverem alterados. Esta padronização é proposta pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, utilizando um painel de 5 marcadores: dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250) (BOLAND et al. 1998; RANGEL et al. 2008).

A maioria das mutações nos genes de reparo resulta em expressão IHQ anormal de suas respectivas proteínas (BOLAND 2005; KIRK 2006). Portanto, outra ferramenta diagnóstica é a análise da expressão IHQ dessas proteínas (RANGEL et al. 2008). A pesquisa da expressão IHQ, principalmente das proteínas MLH1 e MSH2, no tecido tumoral de pacientes com suspeita clínica de SL, tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento, da mesma forma que a pesquisa de MSI, na indicação do sequenciamento para o gene correspondente à proteína não expressa (BAUDHUIN et al. 2005; LAGERSTEDT et al. 2007).

O sequenciamento completo dos genes de reparo de DNA na SL é considerado como uma tecnologia padrão ouro e tem sido descrito como a técnica de maior sensibilidade para detectar a exata localização das mutações germinativas (YUAN et al. 2006), e devido a otimização do processo tem se tornado cada vez mais prático e barato.

O sequenciamento de DNA consiste em métodos bioquímicos que têm como finalidade determinar a ordem das bases nitrogenadas adenina

(A), guanina (G), citosina (C) e timina (T) da molécula de DNA. O método tradicional de sequenciamento de DNA foi proposto por Frederick Sanger na década de 70 e consiste na adição de nucleotídeos modificados, chamados didesoxiribonucleotídeos, que impedem a elongação da cadeia de nucleotídeos pela DNA polimerase, quando são inseridos na cadeia recém-sintetizada (SANGER et al. 1981). Essa metodologia tem sido amplamente usada em diferentes centros de pesquisa e diagnóstico. Atualmente, existem outros métodos modernos de sequenciamento como as estratégias de sequenciamento de próxima geração, que são apropriadas para estudos de rastreamento e busca de novos genes alterados em grande escala (SHENDURE e JI 2008).

1.2.5 Genes de Reparo de DNA, *MLH1* e *MSH2*

Os genes de reparo de DNA apresentam várias funções relacionadas à estabilidade genética, tais como corrigir erros na síntese de DNA, garantir a fidelidade da recombinação genética ou participar nos passos iniciais das respostas apoptóticas a diferentes classes de danos ao DNA (DA SILVA et al. 2009).

De acordo com DE JONG et al. (2004) participam da SL (MIM#120435) os genes *MLH1*(NM_000249.2), *MSH2* (NM_000251.1) e *MSH6* (NM_000179.2).

O gene *MLH1*, localizado no cromossomo 3p22.3, apresenta 19 exons com um total de 2.524 pb e uma proteína de 756 aminoácidos (AA).

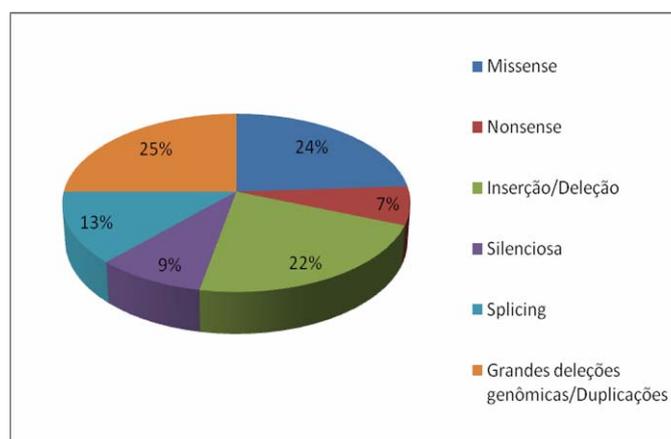
O gene *MSH2*, localizado no cromossomo 2p22-21 com 16 exons de 3.145 pb e uma proteína de 934 AA é o outro gene principal associado a SL. *MSH2* e *MLH1* são responsáveis por mais de 85% de todos os casos de mutações germinativas nos pacientes SL (DA SILVA et al. 2009).

O gene *MSH6*, localizado no cromossomo 2p16 com 10 exons e uma proteína de 1360 AA é responsável por aproximadamente o 10% restante de todos os casos de mutações germinativas nos pacientes SL (Mismatch Repair Genes Variant Database - MMR 2009).

No gene *MLH1*, mais de 45 polimorfismos tem sido identificado nas regiões do gene sem a presença de *hot spots* (BAUDI et al. 2005). A definição comum para os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs) é apresentar uma frequência alélica relativa maior que 0.01. Exceto para os dois polimorfismos no gene *MLH1* (uma deleção TTC na região não traduzida-3'UTR e uma repetição CA no locus D3S1611), todos os SNPs no gene *MLH1* apresentam uma frequência alélica de 0.4% a 50% (PELTOMÄKI e VASEN 1997).

Os principais tipos de alteração encontrados no gene *MLH1* são *missense* (24%-30%), *nonsense* (7%), *splicing* (13%), silenciosa (9%), de pequenas inserções e deleções (22%), sendo todas elas detectáveis pelo sequenciamento direto (OU et al. 2007; MMR 2009) (Figura 3). Com a descoberta da *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) tem sido possível reconhecer surpreendentemente, uma grande proporção de rearranjos genômicos como deleções de um ou mais exons que afetam os genes *MLH1* e *MSH2* (DA SILVA et al. 2009). A porcentagem acometida

pelas grandes deleções ou duplicações para o gene *MLH1* é de aproximadamente 25% (MMR 2009) (Figura 3).



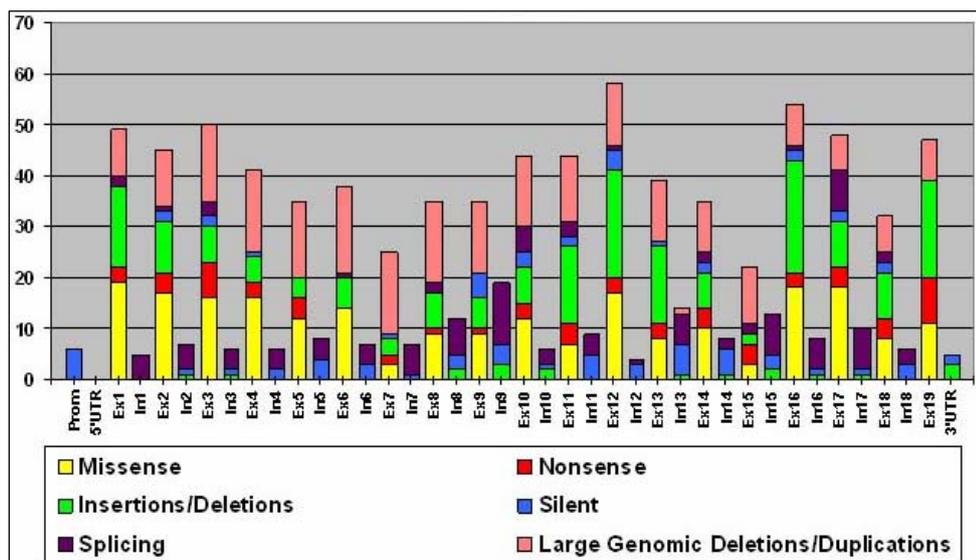
Fonte: MMR (2009)

Figura 3 - Tipos de mutações no gene *MLH1*.

Existem controvérsias respeito às porcentagens dos rearranjos genômicos na SL. ZHANG et al. (2006) avaliaram 16 indivíduos suíços relacionados com suspeita de SL que não apresentaram mutação germinativa nos genes *MLH1* e *MSH2*, e encontraram em cinco deles (31%) deleções genômicas. Por outra parte, PISTORIUS et al. (2007) encontraram 14 rearranjos genômicos em 85 indivíduos com suspeita de SL (16.5%), sendo 4 no gene *MLH1* e 10 no *MSH2*.

As variantes germinativas (*missense*, *nonsense*, silenciosa, *splicing*, inserção, deleções e as grandes deleções e duplicações) do gene *MLH1* têm sido analisadas em nível exônico e estão apresentadas na Figura 4.

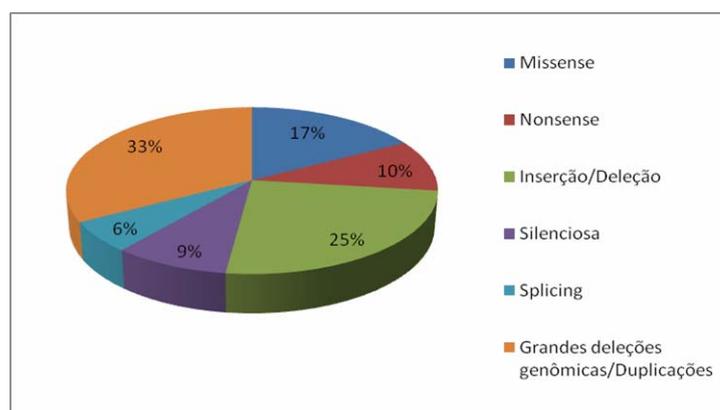
No gene *MLH1*, as variantes germinativas encontram-se com maior frequência nos exons 12, 16, 3, seguidos dos exons 1, 17 e 19 (Figura 4).



Fonte: MMR (2009)

Figura 4 - Frequência das variantes germinativas reportadas para o gene *MLH1* segundo a literatura.

Os principais tipos de alteração encontrados no gene *MSH2* são *missense* (17%), *nonsense* (10%), *splicing* (6%), silenciosas (9%), e as pequenas inserções e deleções (25%) (MMR 2009) (Figura 5). As grandes deleções são mais comuns no gene *MSH2* (33%) que no *MLH1* (22%) e muito raras no gene *MSH6* (2%) (MMR 2009).

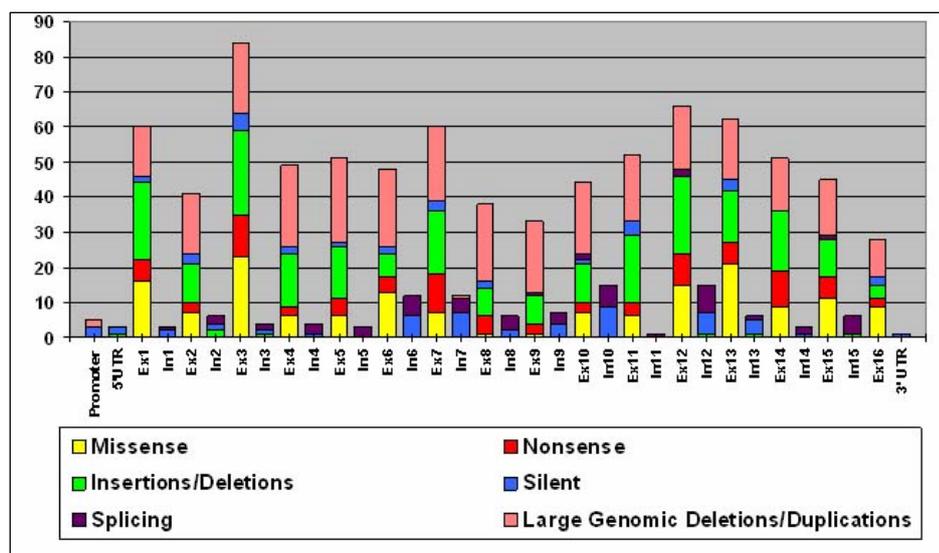


Fonte: MMR (2009)

Figura 5 - Tipos de mutações no gene *MSH2*.

Mutações no gene *MSH2* parecem predispor a um excessivo aparecimento de tumores extracolônicos com um déficit relativo de CCR. Em contraste, mutações em *MLH1* apresentam um baixo risco de tumores extracolônicos e as mutações no gene *MSH6* predispõem a um excessivo aparecimento de câncer endometrial com um déficit relativo de CCR (LYNCH et al. 2007b).

A distribuição exônica das variantes germinativas no gene *MSH2* estão apresentadas na Figura 6. Pode se observar que elas encontram-se com maior frequência nos exons 3, 12, 13, seguidos dos exons 1 e 7 do gene *MSH2*.



Fonte: MMR (2009)

Figura 6 - Frequência das variantes germinativas reportadas para o gene *MSH2* segundo a literatura.

Em 2004, a *International Society of Hereditary Gastrointestinal Cancer* (InSIGHT) publicou seu banco de dados, com 448 mutações patogênicas causadoras de SL, sendo 50% em *MLH1*, 39% em *MSH2*, e 7% em *MSH6*.

Outros genes que participam da SL são os genes *PMS2* (NM_000535), *PMS1* (NM_000534.4) e *MLH3* (NM_001040108). *PMS1* e *MLH3* são genes de reparo de DNA que têm sido ultimamente associados à SL, mas seu papel molecular não está totalmente esclarecido, portanto sua inclusão na família dos genes de MMR associado à SL é discutível (LU e BROADDUS, 2005). Embora o gene *PMS2* seja crucial no sistema de reparo, mutações nesse gene têm sido raramente reportadas na etiologia da SL ou Síndrome de Turcot (HENDRIKS et al. 2006b; DA SILVA et al. 2009).

Mais recentemente, foi criada uma base de dados associada à InSIGHT, à base de dados da *Leiden Open Source Variation* (LOVD), e à

MMR *Genes Variant*, contendo informação sobre 513 variantes associadas a SL (308 para *MLH1*, 180 para *MSH2* e 15 para *MSH6*, 3 para *PMS2* e 7 para *MLH3* (OU et al. 2008; GREENBLATT et al. 2008).

1.2.6 Sistema de Reparo do DNA

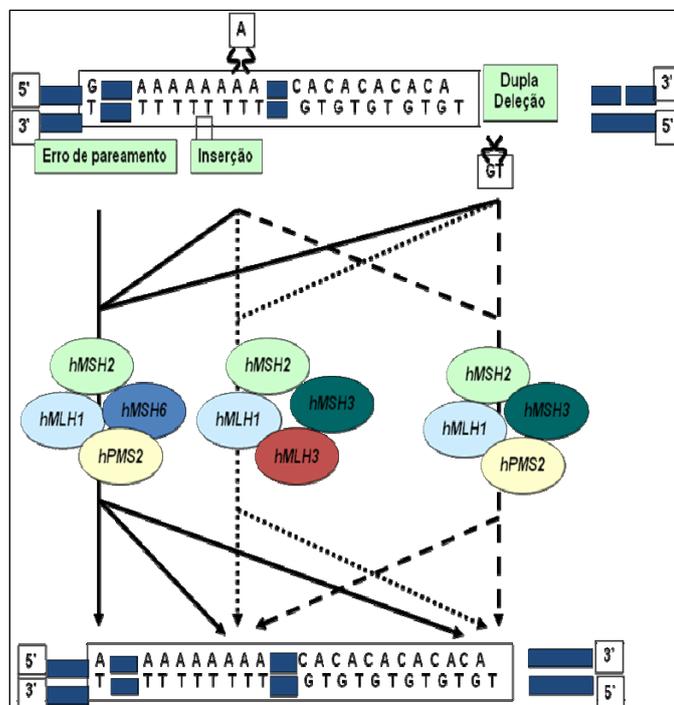
O mecanismo de reparo de DNA apresenta um papel importante na estabilidade genômica, incluindo a correção de bases mal pareadas associadas à replicação e recombinação de DNA (DUARTE-FRANCO e FRANCO 2004).

Os primeiros estudos nos genes de reparo foram desenvolvidos em *Escherichia coli* (*E.coli*). Os homo-oligômeros responsáveis pelo reparo inicial em *E.coli* são MutS e MutL. MutS é responsável pelo reconhecimento dos erros de pareamento e recruta MutL para o local, começando assim as atividades *downstream* (DA SILVA et al. 2009).

As células de eucariotos apresentam três complexos homólogos a MutL de *E. coli*: MLH1-PMS2 (MutL α), MLH1-PMS1 (MutL β) e MLH1-MLH3 (MutL γ). O heterodímero MLH1 e PMS2 intermédia a interação do reconhecimento do erro e de seu reparo (HALVARSSON et al. 2006). Na falta de PMS2, a proteína MLH3 é a candidata para formar o heterodímero com MLH1. MutL γ é o complexo mais ativo nos seres humanos e realiza o reparo iniciado pelo complexo MutS.

As células possuem atividade através de dois homólogos a MutS, que atuam como heterodímeros. MutS α é formado pelo complexo MSH2-MSH6 e MutS β pelo complexo MSH2-MSH3 (Figura 7). O complexo MSH2-MSH6

representa aproximadamente 80-90% de todos os níveis celulares de MSH2 e sua função é reconhecer erros de pareamento de uma ou duas bases, inserções, deleções, assim como grandes deleções e inserções. MSH6 é uma subunidade responsável pelo reconhecimento dos erros de pareamento. O complexo MSH2-MSH3 é responsável pelo reconhecimento e correção de inserções e deleções de 2 a 9 bases na ausência de MSH6 (Figura 7).



Legenda: A dupla cadeia superior apresenta três erros: de pareamento de uma base (G-T), de inserção de uma base (A) e de dupla deleção (GT). Esses erros são alvo dos complexos MSH2/MSH6-MLH1/PMS2. As linhas contínuas mostram a direção do processo de reparo. As linhas descontínuas mostram o processo de reparo na ausência de MSH6, em que as deleções e inserções são corrigidas pelos complexos MSH2/MSH3-MLH1/PMS2.

Fonte: DA SILVA et al. (2009)

Figura 7 - Modelo do sistema de reparo de DNA nas células eucariotas.

1.2.7 Mutações associadas à SL

As mutações genéticas têm diferentes efeitos na etiologia do câncer, dependendo de onde ocorrem e se alteram a função das proteínas essenciais. Estruturalmente, as mutações podem ser classificadas em mutações de pequena e grande escala. As mutações de pequena escala afetam um ou poucos nucleotídeos, e compreendem as mutações pontuais, inserções, duplicações e deleções. As mutações pontuais compreendem as mutações silenciosas (quando o códon codifica para o mesmo AA), *missense* (codifica para um AA diferente), *splicing* (com alteração do sítio de reconhecimento de doador ou receptor de *splicing*) e, finalmente, *nonsense* (codifica para um códon de parada, que interrompe a proteína antes de seu término). As mutações de grande escala afetam grandes regiões cromossômicas que incluem amplificação e deleção.

As mutações nos genes de MMR que produzem truncamento e conseqüentemente a perda de função da proteína afetada (*nonsense*), correspondem às mutações do tipo patogênico. Em nível clínico, as conseqüências das mutações associadas a SL, são frequentemente reportadas como “patogênicas”, “benignas” ou “incertas” (GREENBLATT et al. 2008). As mutações patogênicas têm sido descritas em 88% das famílias que preenchem os critérios de Amsterdam, e em 80% dos pacientes que apresentam MSI (LYNCH et al. 2007a).

As variantes de DNA que não conduzem a um truncamento precoce da proteína apresentam um comportamento menos linear. Dentre essas variações, encontram-se as *missense* (~30% em *MLH1*, ~10% de *MSH2* e

~37% de *MSH6*) (OU et al. 2007). Essas variações apresentam uma natureza incerta em relação às consequências clínicas e moleculares, e têm sido recentemente alvo de muitos estudos, sendo chamadas de “variantes não classificáveis” (UVs - do inglês *unclassified variants*) (OU et al. 2007; OU et al. 2008).

As UVs constituem um problema principal na determinação das consequências clínicas dos pacientes com suspeita de SL. Um estudo recentemente realizado nos genes de MMR demonstrou que apenas o 25% destas variantes *missense* podem ser classificadas como patogênicas ou neutras mediante o critério clínico, e o 75% restante não podem ser classificadas (OU et al. 2008; GREENBLATT et al. 2008).

Portanto, com o esforço de estabelecer a possível patogenezidade das UVs, vários critérios têm sido reunidos, e estão descritos a seguir (OU et al. 2007; OU et al. 2008):

- Aparecimento de novo;
- Segregação na doença por meio dos heredogramas;
- Ausência em indivíduos controles;
- Mudança na polaridade ou tamanho do AA;
- Ocorrência da alteração no AA de um domínio que seja evolucionariamente conservado entre as espécies e/ou compartilhado entre proteínas da mesma família;
- Efeito no *splicing*, mediante a realização de um ensaio funcional ou em um modelo animal.

No caso de câncer genético:

1. Perda de um alelo em um *locus* específico causado por uma grande deleção no tumor (LOH);
2. Perda da expressão protéica do gene alterado no tumor.

No caso de pacientes com suspeita de SL, a MSI do tumor também é considerada.

Nos últimos anos, um grande número de estudos tem focado a atenção nas consequências funcionais das UVs baseados na informação das sequências e nas características estruturais, usando algoritmos computacionais tais como *Sorting Intolerant From Tolerant* (SIFT) (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) e *Polymorphism Phenotyping* (PolyPhen) (<http://www.bork.embl-eidelberg.de/PolyPhen/>) na determinação da patogenicidade das UVs (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009).

SIFT foi desenvolvido por NG e HENIKOFF (2001) na análise de conservação de proteínas. SIFT se baseia na premissa que a evolução protéica está correlacionada com sua função protéica. O princípio do programa se baseia na geração de alinhamentos com um grande número de sequências homólogas, estabelecendo um escore para cada resíduo, variando de 0 a 1, classificando-as as como “intolerante ou com substituição de aminoácidos deletérea” e “tolerante” (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009).

Por outro lado, o *Polyphen* é uma ferramenta computacional que se baseia na combinação filogenética, estrutural e na informação da sequência, caracterizando a substituição e sua posição na proteína. Para a variação de um AA, o programa realiza vários passos: (a) extração da sequência

baseada nas características do sítio de substituição a partir da base de dados UniProt, (b) cálculo do perfil do escore para os dois AA variantes, e (c) cálculo dos parâmetros estruturais e de contato do resíduo substituído. A diferença do *SIFT*, o escore do *Polyphen* classifica as UVs como “benignas”, “provavelmente prejudiciais” e “eventualmente prejudiciais” (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009).

Atualmente, está em discussão a inclusão das análises *in silico* para o estabelecimento da patogenezidade das UVs nos pacientes com suspeita de SL (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009). Alguns estudos sugerem que as predições *in silico* de *MLH1* e *MSH2* sejam complementadas pelos estudos funcionais (COUCH et al. 2008).

1.2.8 Estudos Funcionais das proteínas codificadas pelos genes de MMR

A maioria dos estudos funcionais tem sido desenvolvida para investigar se as UVs encontradas em pacientes suspeitos de SL causam defeitos funcionais que predisõem o desenvolvimento do câncer.

Os ensaios funcionais para o estudo dos genes MMR relacionado a SL podem ser divididos em três categorias (COUCH et al. 2008): ensaios *in vivo*, *in vitro* e ensaios que medem as propriedades bioquímicas e celulares das variantes de MMR.

Os ensaios *in vivo*, são estudos que se baseiam na conservação funcional das proteínas de MMR, permitindo a investigação das consequências funcionais das UVs em ambos os sistemas, autólogos e

heterólogos. Nesse ensaio, é utilizada a *Saccharomyces cerevisiae* como modelo para estabelecer a atividade das variantes dos genes humanos de MMR. O estudo pode ser realizado mediante a expressão da variante correspondente ao gene ortólogo de MMR em levedura. A perda da interferência negativa dominante depois da expressão da variante da proteína MLH1 dentro da levedura com a proteína MMR intacta, poderia indicar sua perda de função.

Estes ensaios são limitados às variantes em regiões conservadas da proteína e o efeito negativo dominante poderia ser dependente parcialmente do gene repórter. Os ensaios baseados no uso de linhagem celular de linfoblastos têm sido também utilizados para avaliar as variantes de MMR (COUCH et al. 2008). No entanto, a sensibilidade e sensibilidade deste ensaio são baixas.

Já os ensaios *in vitro*, são realizados mediante o uso de extratos celulares, os quais são adicionados ao substrato do plasmídeo contendo um erro específico dentro de um sítio endonuclease de restrição. O reparo do erro resulta na restauração do sítio de restrição, o qual permitiria estabelecer a eficiência de reparo mediante a análise do produto clivado no gel de eletroforese. A inclusão de uma variante de MMR neste ensaio permitiria o estabelecimento de sua atividade, portanto, as variantes que perdem atividade são consideradas como patogênicas (COUCH et al. 2008). Várias formas deste ensaio têm sido desenvolvidas como, a introdução de um gene que codifica uma variante em células com uma deficiência endógena do gene seguida da realização do ensaio de MMR em extratos de estas células

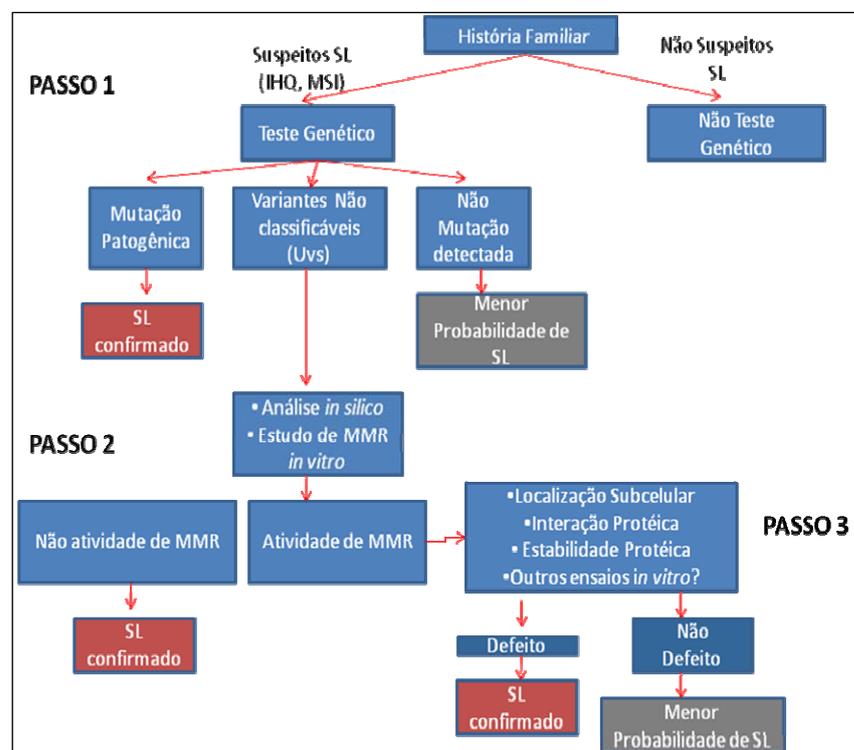
complementadas, e a produção de uma proteína variante (e seu parceiro heterodimérico) em um sistema de expressão heterólogo, tais como células de inseto, seguida pela complementação do extrato celular com uma deficiência no gene no ensaio de MMR (COUCH et al. 2008).

Os resultados *in vitro* são suportados pelas previsões baseadas nos alinhamentos das sequências tanto em nível evolutivo como clínico-patológico, assim como das características bioquímicas como a estabilidade *in vivo*, localização subcelular e heterodimerização. Esse ensaio ainda não apresenta uma forma de validação e é tecnicamente complexo (COUCH et al. 2008).

Finalmente, os ensaios que medem as propriedades bioquímicas e celulares das variantes de MMR focam nos aspectos individuais da função da proteína (por exemplo, ligação entre MSH2/MSH6), no ciclo ADP->ATP e na estabilidade protéica (para ambos os complexos MSH2/MSH6 e MLH1/PMS2) e a localização intracelular assim como a interação proteína-proteína. Embora esses ensaios abordem um específico defeito funcional da proteína conferido por uma variante gênica de MMR, e confirmar e estender a perda da função encontrada nos ensaios *in vitro*, eles não são adequados como rastreamento de rotina para essas variantes (OLILLA et al. 2008, COUCH et al. 2008).

1.2.9 Estabelecimento de um modelo para análise das variantes nos genes MMR

Com base na literatura (COUCH et al. 2008) e nos procedimentos seguidos nos laboratórios de diagnóstico, a análise de variantes nos genes de MMR em pacientes com suspeita de SL, o autor sugere o modelo a seguir (Figura 8).



Fonte: COUCH et al. (2008).

Figura 8 - Modelo proposto para as análises das variantes nos genes de MMR em pacientes com suspeita de SL.

O primeiro passo (Passo 1) no modelo, seria o diagnóstico mediante IHQ e MSI nos pacientes com suspeita de SL. Nos casos com alteração para IHQ e MSI, se realizaria a análise conclusiva mediante sequenciamento direto do gene alterado. A partir do resultado do sequenciamento, se realiza

a classificação da variante, as variantes não caracterizadas segundo sua patogenezidade seguiriam para o Passo 2.

No passo 2, se realizariam as análises de aberrações de *splicing*, conformação da proteína *in silico*, e o teste *in vitro* das UVs. A falta de atividade do gene de MMR alterado nos ensaios *in vitro*, indicaria indiscutivelmente um paciente SL confirmado, podendo ser a UV patogênica ou patogênica menos provável. Se os resultados indicam que a variante apresenta uma deficiência no sistema de MMR, pode se considerar como patogênica.

É importante, saber que um grande número de variantes pode apresentar uma atividade normal nos ensaios *in vitro*. Estas variantes podem ser neutras, sem predisposição ao desenvolvimento do câncer, ou podem apresentar defeitos na localização, expressão ou estabilidade protéica, as quais não são detectadas pelos ensaios *in vitro*. Nesses casos, as variantes continuariam para o Passo 3 que incluem estudos específicos da estabilidade protéica dos genes MMR, interação proteína-proteína e translocações na célula. Essas análises são complexas e requerem de estudos específicos.

1.2.10 Manejo e Vigilância de Pacientes SL

Uma vez que o diagnóstico clínico e molecular seja completado, o risco de CCR para a família pode ser estabelecido segundo a Tabela 1 (HENDRIKS et al. 2006a).

Tabela 1 - Estabelecimento de Risco de Câncer

Genes de MMR	Risco Cumulativo de CCR (aos 70 anos)	Idade Média de Diagnóstico de CCR	Risco Cumulativo de Câncer de Endométrio (aos 70 anos)	Idade Média de Diagnóstico de Câncer de Endométrio
<i>MLH1</i> , homens	65%	43 anos		
<i>MLH1</i> , mulheres	53%	43 anos	27%	48 anos
<i>MSH2</i> , homens	63%	44 anos		
<i>MSH2</i> , mulheres	68%	44 anos	40%	49 anos
<i>MSH6</i> , homens	69%	55 anos		
<i>MSH6</i> , mulheres	30%	57 anos	71%	54 anos

*Diferença não significativa entre homens com mutação em *MSH6* e com mutação em *MLH1* e *MSH2* (P=0.0845).

Fonte: HENDRIKS et al. (2006a)

Ao se identificar uma mutação em um dos genes de MMR, o teste pré-sintomático (teste específico de mutação) fica disponível para todos os membros da família. Esse teste pré-sintomático seria realizado após a discussão sobre os “prós” e “contras” em sessões individuais de aconselhamento genético (HENDRIKS et al. 2006a).

Para os portadores de mutação seriam oferecidas os programas de vigilância periódica. Os não portadores de mutação podem ser afastados dos programas de seguimento e vigilância (HENDRIKS et al. 2006a) e seu seguimento deve ser feito somente em casos com sintomas clínicos específicos (ROSSI et al.1997).

Quando a mutação não for identificada embora a família preencha os Critérios de Amsterdam, o protocolo de vigilância para os suspeitos de SL também seria recomendado.

A Tabela 2 demonstra o protocolo atual de vigilância seguida na Holanda para portadores de mutação em um dos genes de MMR (HENDRIKS et al. 2006a).

Tabela 2 - Protocolo Atual de Vigilância na Holanda para Portadores de Mutação nos genes de MMR.

Vigilância	<i>MLH1, MSH2, MSH6</i> (homens)	<i>MSH6</i> (mulheres)
Cólon	Colonoscopia, a cada 1 a 2 anos, começando aos 20-25 anos	Colonoscopia, a cada 1 a 2 anos, começando aos 30 anos
Endométrio	Ultrasom e CA-125, a cada 1 a 2 anos, começando aos 30-35 anos	Ultrasom e CA-125, a cada 1 a 2 anos, começando aos 30-35 anos. Considerar histerectomia aproximadamente aos 50 anos
Trato Urinário Superior	Análise de citologia da urina, a cada 1 a 2 anos, começando aos 30-35 (<i>MSH6</i> a partir dos 50 anos) anos, se ocorrer duas o mais vezes na família	Análise de citologia da urina, a cada 1 a 2 anos, começando aos 50 anos, se ocorrer duas o mais vezes na família
Estômago	Gastroscoopia a cada 1 a 2 anos, começando aos 30-35 anos, se ocorrer duas o mais vezes na família	Gastroscoopia a cada 1 a 2 anos, começando aos 30-35 anos, se ocorrer duas o mais vezes na família

No entanto, estas recomendações estão sendo atualmente discutidas devido a alta frequência de colonoscopias em portadores de mutação em um dos genes de MMR detectadas pela MSI (HENDRIKS et al. 2006a).

Com base em vários estudos realizados, recomenda-se a colonoscopia a cada 1-3 anos começando a partir dos 20-25 anos para indivíduos com mutação identificada nos genes de MMR. O Grupo Colaborativo Internacional em SL recomenda um intervalo de dois anos entre cada colonoscopia, mas de 1 a 3 anos em programas nacionais de

vigilância. Os cânceres assintomáticos são diagnosticados em um período de vigilância dentro de um intervalo de dois anos. Alguns autores recomendam um intervalo de vigilância de um ano, mas não existem evidências conclusivas sobre o melhor intervalo de tempo (HENDRIKS et al. 2006a; LYNCH et al. 2009a).

O risco de desenvolver CCR antes dos 30 anos é baixo em famílias com mutação em *MLH1* ou *MSH2* e muito menor em famílias com mutação no gene *MSH6*. Portanto, seria apropriado aplicar um intervalo maior de tempo durante os dez primeiros anos de vigilância (entre os 20 e 30 anos de idade) e um intervalo menor após os 30 anos (MECKLIN 2008).

O estabelecimento de uma rotina de atendimento dos pacientes, e de suas famílias, portadores de CCR com predisposição hereditária é fundamental. Esse atendimento deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar, com as informações organizadas em um registro de famílias (banco de dados), e deve incluir aconselhamento de risco, com indicação de testes genéticos de predisposição, rastreamento, tratamento e seguimento (ROSSI et al. 1997).

Embora existam alguns estudos isolados sobre a SL em pacientes sul-americanos, a utilidade deste tipo de abordagem diagnóstica só foi avaliada, até este momento, em populações norte-americanas e européias. Em razão da grande diversidade de etnias existente na América do Sul, torna-se imperativa a avaliação de, pelo menos, parte dessa população.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

O objetivo geral deste trabalho é a avaliação de mutação germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2*, em pacientes não relacionados, afetados por tumores típicos de SL.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Determinar a significância patogênica das mutações encontradas por meio da revisão na literatura e nas bases de dados.
- ✓ Caracterizar as mutações não descritas mediante os programas *Polyphen* e *SIFT*.
- ✓ Definir a frequência das mutações encontradas nos genes *MLH1* e *MSH2* e os critérios clínicos de Amsterdam ou Bethesda.

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

3.1.1 Caracterização e Critérios de Inclusão dos Pacientes

Foram analisadas amostras de sangue periférico provenientes de pacientes atendidos no Serviço de Cirurgia Pélvica do Hospital AC Camargo no período de 1992 até 2008.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Indivíduos com CCR que preencheram os Critérios de Bethesda ou que pertenciam a famílias que preencheram os Critérios de Amsterdam;
- Indivíduos com adenomas com displasia de alto grau pertencentes a famílias que preencheram os Critérios de Amsterdam, na ausência de indivíduos vivos com CCR disponíveis para coleta de sangue periférico.

3.1.2 Coleta de Dados

Os pacientes foram selecionados a partir do Registro de Câncer Colorretal (RCCR) do Hospital AC Camargo.

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Coleta das Amostras de Sangue Periférico

As amostras de sangue periférico de cada paciente foram coletadas em dois tubos (*vacutainer* com EDTA) e levadas, imediatamente, ao laboratório para purificação de ácidos nucléicos onde foram mantidas a 4°C até o momento da purificação de DNA. O intervalo de tempo das amostras de sangue periférico armazenadas a 4°C foi de no máximo de cinco dias.

3.2.2 Separação dos Leucócitos

O processamento se baseou na separação dos leucócitos por meio do Tris-EDTA-TE pH 8,0, até a obtenção de um *buffy coat* ou *pellet*.

O procedimento consistiu na transferência do sangue periférico de cada paciente para um tubo de 50 ml. O volume foi completado com TE (pH 8,0) até 40ml e submetido a *vortex* por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugado a 2000 rpm por 7 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, foi aspirado 35ml do volume e deixou-se 5ml no tubo, o qual foi submetido a *vortex* e adicionado 15ml de TE até completar 20ml no tubo de 50ml; submetido a *vortex* por 2 minutos (ou até ficar homogêneo) e centrifugado a 2000 rpm por 7 minutos a temperatura ambiente. Os passos da aspiração até a centrifugação foram repetidos duas vezes. Finalmente, foram aspirados 18 ml do lisado, submetido à *vortex* os 2 ml restantes e distribuído em 2 tubos de 1,5ml (aproximadamente, 1ml para cada tubo); centrifugado por 2 minutos a 14000 rpm a temperatura ambiente e desprezado o

sobrenadante. O *pellet* foi armazenado a -80°C até o momento da extração de DNA. Nessa condição a amostra pode ser armazenada por longos períodos.

3.2.3 Purificação de DNA

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

O segundo tudo de *buffy coat* foi submetido ao mesmo processo para extração do DNA e usado para confirmação da mutação encontrada.

3.2.4 Quantificação e Qualidade de DNA Genômico

Os DNAs genômicos foram quantificados no NanoDrop ND-1000 e avaliados quanto a pureza através da determinação de OD 260 e 280 (Figura 9).

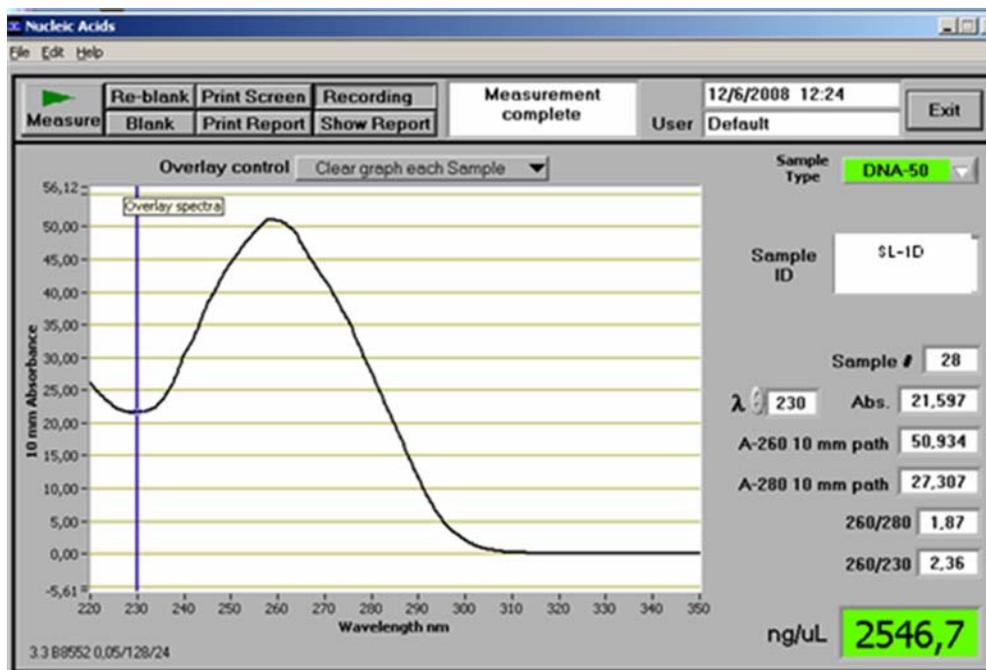


Figura 9 - Perfil da quantificação de DNA mediante NanoDrop ND 1000, mostrando uma alta quantidade e pureza de DNA.

A avaliação da integridade da molécula de DNA foi realizada em gel de agarose 0,8% em uma corrida com duração de 60 minutos na voltagem de 100 mV. Aproximadamente 1µg de DNA é adicionado a 4µl de tampão TE com 2µl do *Loading Buffer* 6X com glicerol. O critério de avaliação da

qualidade de DNA seguiu os parâmetros utilizados no banco de ácidos nucleicos dessa instituição, sendo:

- 1 Excelente, apresenta banda única sem *smear* (aproximadamente 15 000 pb sem degradação);
- 2 Ótimo, apresenta banda com *smear*;
- 3 Bom, não apresenta banda e os fragmentos ficam em torno de 600-15000 pb.

3.2.5 Amplificação das Sequências de DNA

- **Desenho dos Iniciadores**

As sequências genômicas dos genes *MLH1* e *MSH2* foram obtidas a partir do banco *NCBI/Nucleotide* (NM_000249.2 e NM_000251.1, respectivamente). Essas sequências foram utilizadas como base para o desenho dos iniciadores, os quais foram desenhados nas regiões intrônicas a aproximadamente 70b do limite exon-intron. Os iniciadores foram denominados com o nome do gene *MLH1* ou *MSH2* e identificados individualmente de acordo com a região onde se encontram. O primeiro par de iniciadores foi denominado MLH1-E1 (gene *MLH1*, exon 1) com um fragmento de 226 pb e assim por diante para os outros exons e, o mesmo para os exons do gene *MHS2*. A Figura 10 ilustra a localização dos fragmentos no gene *MLH1*.

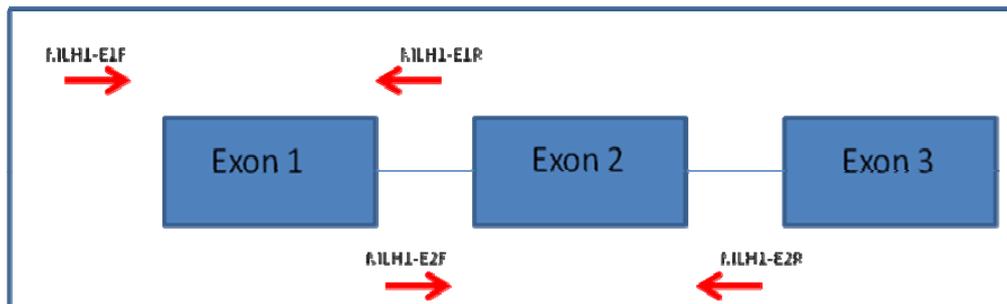


Figura 10 - Diagrama representativo da localização dos fragmentos amplificados com os iniciadores para os exons do gene *MLH1*.

Para o desenho dos iniciadores procurou-se seguir alguns critérios com a finalidade de facilitar a extensão dos amplicons. A composição de bases C e G dos iniciadores ficaram em torno de 60%, comprimento de no mínimo 15 bases e diferença em graus de temperatura de alinhamento entre os pares de iniciadores de no máximo 2°C. Para verificar a presença de estruturas secundárias (*stem loop* e *homodimer*) foi utilizado o programa OLIGOTECH versão 1.00 (Copyright© 1995), para as quais foram permitidas temperaturas de no máximo 20°C. Os iniciadores *Forward* e *Reverse* foram desenhados em distancias de no máximo de 300pb. Todos os iniciadores foram diluídos a uma concentração estoque de 100 µM, de onde foram feitas alíquotas de 10µM, as quais foram utilizadas nas reações de PCR.

- **Seleção de Amostra Referência**

Uma amostra de um indivíduo sem histórico de doença neoplásica (amostra referência) foi utilizada para geração dos fragmentos controles usados para o estabelecimento da metodologia de sequenciamento direto.

- **Estabelecimento das Reações de PCR para avaliação por sequenciamento direto**

A amplificação de todos os fragmentos dos genes *MLH1* e *MSH2* foi realizado com 10µl de PCR Master Mix (Promega, USA) para reação de sequenciamento direto, e as aliquotas (5,0µL) dos produtos de PCR adicionados a 3µl do *Loading Buffer* 6X com glicerol, foram diretamente aplicadas em gel de agarose 1% corado com gel *red* com duração aproximada de 40 minutos na voltagem de 150V.

3.2.6 Detecção de Mutações por Sequenciamento Direto

- **Análise da Amostra Referência**

Todos os fragmentos dos genes *MLH1* e *MSH2* da amostra referência, foram amplificados e sequenciados completamente no aparelho ABI 3130 (Applied Biosystems), usando o kit de sequenciamento BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems, SP, Brasil). As sequências dos genes *MLH1* e *MSH2* obtidas da amostra referencia foram alinhadas com a sequência depositada no banco NCBI-Nucleotide através da ferramenta *blast 2 sequences* disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Essa sequência do banco NCBI foi utilizada para comparação e verificação da normalidade das sequências da amostra referencia. Apartir desse momento, a sequencia da amostra referencia foi utilizada como padrão para avaliação das sequências dos amplicons dos pacientes.

- **Detecção de Mutação nos Genes *MLH1* e *MSH2***

As reações de PCR de cada fragmento foram purificadas com o uso da reação enzimática exonuclease I e fosfatase alcalina (EXO-SAP IT-USB/GE) na proporção de 8µl de PCR para 1µl da mistura das enzimas. A reação foi incubada por 30 minutos a 37°C, seguida da inativação das enzimas a 80°C por 15 minutos, conforme protocolo recomendado pelo fabricante.

O sequenciamento direto dos produtos de PCR de todos os exons de *MLH1* e *MSH2* de cada paciente foi realizado a partir de 2,5µl do volume final da purificação enzimática, com os próprios iniciadores utilizados nas respectivas reações.

Para cada reação de sequenciamento foram utilizados 2,5 µl de DNA e 0,5µl de BigDye® Terminator v3.1 (Applied Biosystems, SP, Brasil) e o par de iniciador específico para cada fragmento (Tabela 3).

Tabela 3 - Concentrações finais dos reagentes utilizados nas reações de sequenciamento.

Reagente	Concentração Final
Água Milli-Q	Qsp
Tampão	1X
Iniciadores	5 µM
Big Dye™	0,5µl
Produto de PCR purificado	50ng

Os programas de termociclagem utilizados para as reações de sequenciamento estão descritos na Tabela 4. Todos os fragmentos foram sequenciados nos sentidos *forward* e *reverse*.

Tabela 4 - Programas definidos para cada par de iniciadores dos genes *MLH1* e *MSH2*.

Ciclos	Temperatura	Tempo
Passo 1	95°C	00:02:00
Passo 2	95°C	00:00:18
Passo 3	50°C	00:00:18
Passo 4	60 °C	00:04:00
Passo 5	Voltar ao passo 2	40X
Passo 6	4 °C	Infinito

O método para precipitação da reação de sequenciamento utilizado foi por Etanol/EDTA, como sugerido pelo fabricante (Applied Biosystems, SP, Brasil) (Anexo 1).

As amostras foram ressuspendidas em 15 µl de formamida Hi-Di (Applied Biosystems, SP, Brasil), desnaturadas a 95°C em termociclador por 3 minutos e imediatamente acondicionadas em gelo por 5 minutos. O sequenciamento foi realizado em Sequenciador Automático de DNA, AbiPrism 3130 da Applied Biosystems.

- **Confirmação das Mutações encontradas nos Genes *MLH1* e *MSH2***

As mutações encontradas nos genes *MLH1* e *MSH2* foram confirmadas no segundo tubo de *buffy coat* do paciente e mediante nova reação de PCR com a utilização da enzima *Taq* Platinum High Fidelity (Invitrogen, SP, Brasil), seguida de sequenciamento.

3.3 ANÁLISE DE RESULTADOS

3.3.1 Características Clínicas dos Pacientes

As características clínicas e história familiar dos pacientes foram realizadas utilizando o programa SPSS for Windows versão 16.

3.3.2 Descrição das Mutações Encontradas

A nomenclatura utilizada para as mutações encontradas foi baseada no trabalho proposto por DEN DUNNEN e ANTONARAKIS (2000). A avaliação e edição dos resultados foi realizada utilizando o Software CLC Bio.

3.3.3 Interpretação das Mutações Descritas

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

- ✓ InSIGHT- *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*
(<http://www.insight-group.org/>)
- ✓ *MMR Gene Unclassified Variants Database*
(www.mmruv.info)
- ✓ Mismatch Repair Genes Variant Database
(<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/>)
- ✓ The Human Gene Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff

(<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)

3.3.4 Interpretação das Mutações Não Descritas

Tendo em vista a dificuldade na determinação da patogenicidade de algumas mutações não descritas nos genes *MLH1* e *MSH2*, optou-se por uma classificação própria descrita a seguir.

As mutações dos tipos *nonsense*, pequenas duplicações, deleções e inserções foram classificadas como mutações patogênicas, uma vez que ocasionam interrupção da proteína ou mudança no quadro de leitura.

As mutações que afetaram sítios doadores ou receptores de *splicing*, também foram classificadas como patogênicas, uma vez que afetam o processo de *splicing* do RNAm, afetando, conseqüentemente, a estrutura da proteína.

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

- Polyphen - *Polymorphism Phenotyping*
(<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/>)
- SIFT - *Sorting Intolerant from Tolerant*
(<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>)

Os valores do SIFT são de 0 a 1, escores $\leq 0,05$ foram considerados como “intolerante” ou “substituição de aminoácidos deletérea”, enquanto escores $\geq 0,05$ foram consideradas como “tolerante”, seguindo as recomendações do programa.

Os níveis estruturais de alteração foram determinados aplicando o *Polyphen*. Os valores do *Polyphen* são de 0 a 3.37, escores >2.0 foram considerados como “provavelmente prejudicial”, enquanto escores de 1.50-1.99 indicaram que a variante poderia ser “eventualmente prejudicial” e os escores de 0 a 1.49 como “benignos”, seguindo as recomendações do programa.

3.4 QUESTÕES ÉTICAS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo em 06 de Setembro de 2006 sob o número 831/06 (Anexo 2).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DOS PACIENTES

Foram analisados 99 indivíduos não relacionados do RCCR do Hospital A.C Camargo que preencheram os critérios de inclusão para o estudo. Destes, 32 (32,3%) eram do sexo masculino, e 67 (67,7%) do sexo feminino.

Os pacientes foram distribuídos de acordo aos critérios clínicos de inclusão no estudo: Amsterdam I, Amsterdam II e Bethesda, e suas frequências foram calculadas e estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 – Distribuição dos pacientes selecionados de acordo ao critério clínico utilizado.

Critério Clínico	N	%
Critérios Amsterdam I	38	38,4
Critérios Amsterdam II	3	3,0
Critérios de Bethesda	58	58,6
Total	99	100,0

Pode se observar que aproximadamente dois terços dos pacientes preencheram os critérios de Bethesda (58,6%) enquanto um terço preencheu os critérios de Amsterdam I (38,4%).

A Tabela 6 demonstra os diferentes tipos de tumor diagnosticados, a idade média e a variação da idade ao diagnóstico nos pacientes estudados (Tabela 6).

Tabela 6 – Tumores diagnosticados, número de pacientes afetados, idade média e variação da idade ao diagnóstico nos pacientes estudados.

Tumores	Número de pacientes afetados	Idade Média ao Diagnóstico	Varição da Idade ao Diagnóstico
Colorretal	89	42,55	15-72
Adenomas	36	45,8	24-72
Endométrio	8	44,63	31-52
Mama	5	47,8	33-64
Intestino Delgado	3	42,0	32-51
Estômago	2	47,5	42-53
Hepático	1	50,0	-
Pelve Renal e/ou	1	44,0	-
Ovário	1	37,0	-
Pâncreas	1	69,0	-

Dos 99 pacientes estudados, 15 deles apresentaram mais de dois tumores malignos, enquanto sete pacientes apresentaram três, e um paciente apresentou quatro tumores primários. Os pacientes foram classificados quanto à localização do tumor e ao seu estadiamento patológico e estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 – Distribuição de 89 pacientes com CCR incluídos no estudo quanto à localização e ao seu estadiamento patológico.

Localização do tumor e estadiamento	N	%
Localização do tumor		
Colon proximal	27	20,3
Colon distal	21	23,6
Reto	28	31,5
Sincronico	9	10,1
Metacronico	1	1,1
Ignorado	3	3,3
Estádio T		
To	3	3,4
T1-T2	27	30,3
T3-T4	45	50,5
Tx	14	15,7
Estádio N		
N0	54	60,7
N1-N2	22	24,7
Nx	13	14,6
Estádio M		
M0	82	92,1
M1	6	6,7
Mx	1	1,1

A localização dos tumores dos pacientes analisados apresentou predileção pelo reto (31,5%), seguida do colon proximal e distal (30,3% e 23,6% respectivamente). Enquanto ao estadiamento TNM da localização dos tumores, 50,5% deles foram classificados como estágio T3-T4, 60,7% como N0 e 92,1% como M0.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS ESTUDADAS

Foram purificados 99 DNAs de pacientes seguindo os protocolos de separação de leucócitos e purificação de DNA descritos na metodologia do presente trabalho. As amostras foram quantificadas através do Nanodrop ND-1000 mediante a análise espectrofotométrica e avaliadas em gel de agarose 0,8% (Figura 11), apresentando uma alta qualidade e pureza. A quantidade de DNA das amostras variou de 8 a 415 μg , apresentando qualidade satisfatória para a avaliação dos genes (Anexo 3).

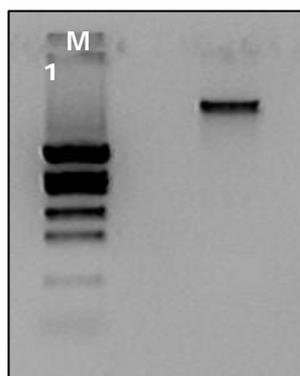


Figura 11 - Fotografia do gel de agarose 0,8%, onde M= marcador de peso molecular (1Kb) e Linha 1= DNA genômico do paciente SL-1D.

4.3 ESTABELECIMENTO DAS REAÇÕES DE PCR DOS GENES *MLH1* E *MSH2* POR SEQUENCIAMENTO DIRETO

O gene *MLH1* foi dividido em 20 fragmentos compreendendo os 19 exons com suas respectivas sequências intrônicas adjacentes (o exon 12 foi subdividido em dois fragmentos).

O gene *MSH2* também foi dividido em 20 fragmentos compreendendo os 16 exons com suas respectivas sequências intrônicas (os exons 3, 7, 12 e 14 foram divididos em dois fragmentos cada).

Na Tabela 8 estão especificadas as sequências dos iniciadores e o tamanho do amplicon para cada gene.

Tabela 8 - Sequências nucleotídicas dos 40 iniciadores para os genes *MLH1* e *MSH2* e sua localização no gene e o tamanho de cada fragmento amplificado.

IDENTIFICAÇÃO DO INICIADOR	EXON	PRIMER F (5'-3')	PRIMER R (5'-3')	EXON (PB)	DNA AMPLIFICADO (pb)
MLH1-E1	1	GTGATTGGCTGAAGG	CGTTAAGTCGTAGC	176	226
MLH1-E2	2	CATTAGAGTAGTTGCAGAC	CAGAACAGAGAAAGGTCC	91	210
MLH1-E3	3	GAAAATGGGAATCAAAGAG	GACAGACAATGTCATCACAG	99	229
MLH1-E4	4	CTTTGGTGAGGTGACAGTG	GATTACTCTGAGACCTAGGC	74	217
MLH1-E5	5	CTACTGGATATTAATTTG	CAATTTACTCTCCCATGTAC	73	137
MLH1-E6	6	CCTCGCTTTTGCCAGGAC	CTCAGAGACCCACTCCC	92	205
MLH1-E7	7	GCTCTGACATCTAGTGTG	GCAAACATATAAAAATCCCC	43	175
MLH1-E8	8	CCTTGTGTCTTCTGCTG	GTGATGGAATGATAAACC	89	182
MLH1-E9	9	GTTAGTTTATGGGAAGG	GTGTTTCCTGTGAGTG	113	259
MLH1-E10	10	CCTGTGACCTCACCCC	GAGCCTGATAGAACATCTG	94	212
MLH1-E11	11	CCTCCCACTATCTAAG	CAGAGAAGTAGCTGG	154	231
MLH1-E12-I	12	CTTATTCTGAGTCTCTCCAC	CTGGACAGGGGTTTGCTC	371	251
MLH1-E12-II	12	GATTCCCGGGAACAG	GGAGGTAGGCTGTAC	371	285
MLH1-E13	13	GATCTGCACTTCCTTTTC	CCCTATGCATCCCAG	149	214
MLH1-E14	14	GGATTCTATTACTTACCTG	CTGGACCATTGTTGTAG	109	207
MLH1-E15	15	CCCAACTGGTTGTATCTC	GATATTAGTGGAGAGCTAC	64	203
MLH1-E16	16	CTCCGTTAAAGCTTGC	GAATACAACAGAAGTATAAG	165	241
MLH1-E17	17	GTTTAAACTATGACAGC	GTCATTTGCCCTTTCC	93	216
MLH1-E18	18	GTAGTCTGTGATCTCCG	CCTGTCCTAGTCCTG	114	233
MLH1-E19	19	CAAACAGGGAGGCTTATG	GAGAAAGAAGAACACATCCC	361	247
MSH2-E1	1	CAACCAGGAGGTGAGGAG	CAGCACGCGCCGTCC	279	262
MSH2-E2	2	CAGTGCTTGAACATG	CTACTATCACAATCTAC	155	314
MSH2-E3-I	3	GGTTCATAGAGTTTGG	GCCTCAAGATTGGAG	279	293
MSH2-E3-II	3	GGTTGGAGTTGGGTATG	CCTGGAATCTCCTCTATC	279	204
MSH2-E4	4	GGTGAATCTGTTATC	GTCACTATAGTTTAC	147	329
MSH2-E5	5	CAGTGGTATAGAAATCTTCG	CCATTCAACATTTTTAACC	150	241
MSH2-E6	6	GTTTTCACTAATGAGCTTGC	GTGGTATAATCATGTGGG	134	251
MSH2-E7-I	7	GACTTACGTGCTTAGTTG	GCTTGTCTTTGAAACTTC	200	192
MSH2-E7-II	7	CTTCGTCGATTCCCAG	GAGGACAGCACATTGC	200	206
MSH2-E8	8	GCTTGTATCTCAGTC	GGTGCTACAATTAGATAC	110	299
MSH2-E9	9	GTCTTACCCATTATTTATAG	GTATAGACAAAAGAATTATTC	124	217
MSH2-E10	10	GTTGTCATATAATAACAG	CACATCATGTTAGAGC	151	327
MSH2-E11	11	CACATTGCTTCTAGTACAC	CTGTTACAAAAGCCAG	98	211
MSH2-E12-I	12	GTGTAAATTAGGAAATGGG	CAAGCATGCCTGGATG	246	283
MSH2-E12-II	12	GCTCACGTGTCAAATG	GTTACCCCACAAAG	246	217
MSH2-E13	13	GTTTAAATCTTGCTTTCTG	CTTCAAGGGACTAGGAG	205	270
MSH2-E14-I	14	GTATGTGTATGTTACCAC	GAAAATGGGTTGCAAAC	248	202
MSH2-E14-II	14	GGATTGGGTTAGCATG	CTGAATTTAGAGTACTCC	248	214
MSH2-E15	15	GTCCCCTCACGCTTC	GAGAAGCTAAGTTAAACTATG	176	245
MSH2-E16	16	CTAATGGGACATTAC	CTTCATTCCATTACTGG	443	221

4.4 RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES POR SEQUENCIAMENTO DIRETO NO GENE *MLH1*

4.4.1 Frequência dos tipos de alteração

Dos 99 pacientes analisados para o gene *MLH1* foram identificadas 24 alterações de pequena escala, sendo do tipo pontual (*missense*, *nonsense*, *splicing* e silenciosa), deleção, inserção e duplicação, em 21 pacientes não relacionados (21,1%).

Quando foi analisado o tipo de alteração mais frequente no gene *MLH1*, observou-se que o tipo pontual foi o mais frequente (76%), sendo representado por 11 *missense* (42%), 4 *nonsense* (15%), 4 *splicing* (15%) e 1 silenciosa (4%), seguida dos tipos de deleção com 3 alterações (12%), 2 inserções (8%) e finalmente 1 duplicação (4%).

A frequência dos tipos de alteração encontrados no gene *MLH1* está apresentada na Figura 12.

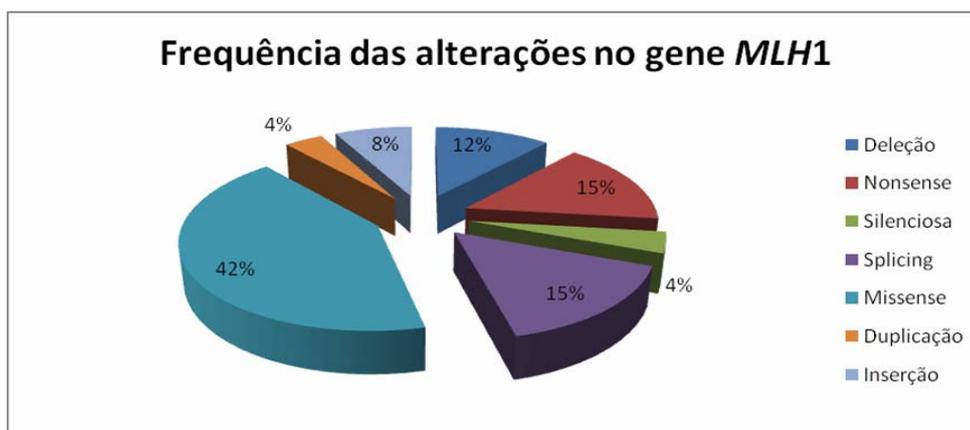


Figura 12 - Frequência dos tipos de alterações no gene *MLH1*.

4.4.2 Frequência dos exons alterados no gene *MLH1*

Com base nas 24 alterações encontradas para o gene *MLH1*, foi possível calcular a frequência dos exons alterados no gene.

Os exons mais afetados foram os exons 16 e 19, com 4 alterações cada, representando uma frequência de 16,7% cada, seguida do exon 18 com 3 alterações (12,5%), e dos exon 7, 8 e 17 com 2 alterações cada (8,3% cada). A frequência dos exons afetados está apresentada na Figura 13.

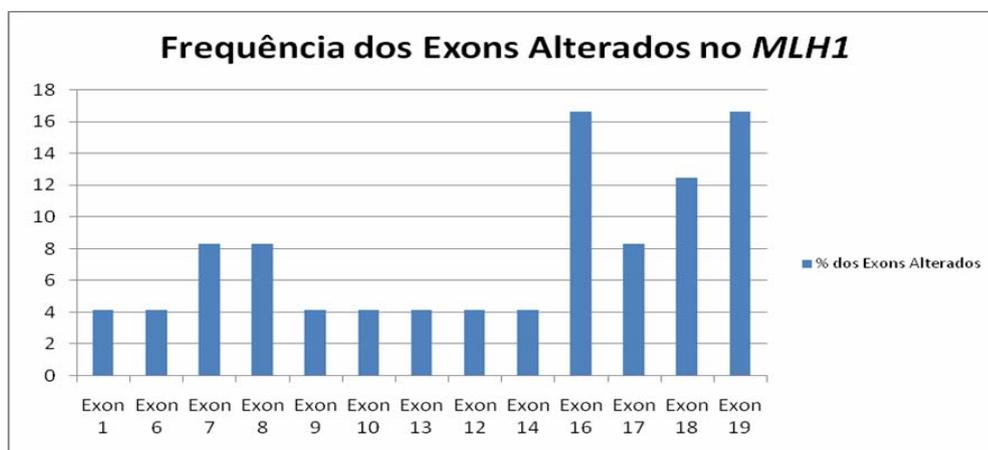


Figura 13 - Frequência dos exons afetados no gene *MLH1*.

4.4.3 Interpretação das mutações do gene *MLH1*

A caracterização e interpretação das 24 alterações encontradas no gene *MLH1* foram realizadas de acordo com as seguintes etapas, a primeira etapa consistiu na consulta nas bases de dados descritas anteriormente. No caso da alteração não descrita nas bases de dados, seguiu-se a segunda etapa, que foi a consulta na literatura. Finalmente, a terceira etapa consistiu na utilização dos programas de predição SIFT e *Polyphen* para aquelas alterações do tipo *missense* que não foram descritas nem nas bases de dados nem na literatura.

A classificação enquanto à patogenicidade das alterações foi descrita como patogênicas, benignas ou incertas.

A Tabela 9 demonstra as características enquanto a posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, programas SIFT e *Polyphen*, e finalmente a classificação estabelecida no presente estudo das alterações encontradas no gene *MLH1*.

Tabela 9 - Descrição da posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, *SIFT* e *Polyphen* e no presente estudo das alterações encontradas no gene *MLH1*.

ID PACIENTE	POSIÇÃO E DEFINIÇÃO DA ALTERAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE ALTERAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A BASES DE DADOS CONSULTADAS	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A LITERATURA	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO PROGRAMAS DE PREDIÇÃO <i>SIFT</i> E <i>POLYPHEN</i>	CLASSIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO NESSE ESTUDO
SL-1D	c.545+3(A->G)	Intron 6	<i>Splicing</i>	Patogênica	Patogênica (PENSOTTI et al. 1997)	-	Patogênica
SL-1D	c.2152(C->T)	Exon 19	<i>Missense</i>	Patogênica	Potencialmente Intolerante/Provavelmente prejudicial (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009)	Intolerante/Provavelmente prejudicial	Patogênica
SL-18D	c.588+5(G->C)	Intron 7	<i>Missense</i>	Desconhecida	Descrita como sitio doador de splicing (A) (PELTOMÄKI e VASEN. 1997)	-	Não Patogênica
SL-19D	c.2224(C->T)	Exon 19	<i>Nonsense</i>	Não descrita	Tem sido descrita uma deleção de (T) (PELTOMÄKI e VASEN. 1997)	-	Patogênica
SL-21D	c.779(T->G)	Exon 9	<i>Missense</i>	Não descrita	-	Provavelmente prejudicial/Intolerante	Patogênica
SL-29D	c.588+2(T->A)	Intron 7	<i>Splicing</i>	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-31D	c.791-6_793delgttagatc	Exon 10	Deleção	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-33D	c.1743(G->C)	Exon 16	Silenciosa	Não descrita	-	-	Não Patogênica
SL-36D	c.2027(T->C)	Exon 18	<i>Missense</i>	Desconhecida	-	Eventualmente prejudicial/Intolerante	Patogênica
SL-38D	c.1852_1853del(AA)Ins GC	Exon 16	Deleção/Inserção	Desconhecida	Benigna (PELTOMÄKI e VASEN. 1997)	Benigno	Não Patogênica
SL-54D	c.1853delA Ins TTCTT	Exon 16	Deleção/Inserção	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-54D	c.2066(A->G)	Exon 18	<i>Missense</i>	Incerta	Patogênica/Não Patogênica/Incerta	Benigna/Tolerante	Não Patogênica

SL-67D	c.1820(T->A)	Exon 16	Missense	Não descrita	-	Eventualmente prejudicial /Intolerante	Patogênica
SL-81D	c.-53(G->T)	5'UTR	-	Não descrita	-	-	Não patogênica
SL-82D	c.2152(C->T)	Exon 19	Missense	Incerta	Patogênica/Não Patogênica/Incerta (DOSS e SETHUMADHAVAN 2009)	Provavelmente prejudicial/ Intolerante	Patogênica
SL-92D	c.1975(C->T)	Exon 17	Nonsense	Desconhecida	Patogênica (PELTOMÄKI e VASEN. 1997)	-	Patogênica
SL-93D	c.2041(G->A)	Exon 18	Missense	Provavelmente Patogênica	Patogênica/Não Patogênica/Incerta	Provavelmente prejudicial/ Intolerante	Patogênica
SL-94D	c.1459(C->T)	Exon 13	Nonsense	Desconhecida	Patogênica	-	Patogênica
SL-97D	c.1644dupTTATA	Exon 14	Duplicação	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-2-1D	c.545+3(A->G)	Intron 6	Splicing	Patogênica	Patogênica (PENSOTTI et al. 1997)	-	Patogênica
SL-2-6D	c.1276(C->T)	Exon 12	Nonsense	Patogênica	Patogênica	-	Patogênica
SL-2-8D	c.677(G->A)	Exon 8	Missense	Incerta	Patogênica/Não Patogênica/Incerta (PELTOMÄKI e VASEN. 1997; ZAVODNA et al. 2006; PARK et al. 2008)	Benigno/Tolerante	Não Patogênica
SL-2-9D	c.1963(A->G)	Exon 17	Missense	Incerta	Patogênica/Não patogênica	Benigno	Não Patogênica
SL-2-9D	c.2146(G->A)	Exon 19	Missense	Não Patogênica/Incerta	Raro Polimorfismo (KÁMORY et al. 1997)	Benigno/Tolerante	Não Patogênica

ID: Identificação do Paciente; (-): Não aplicável

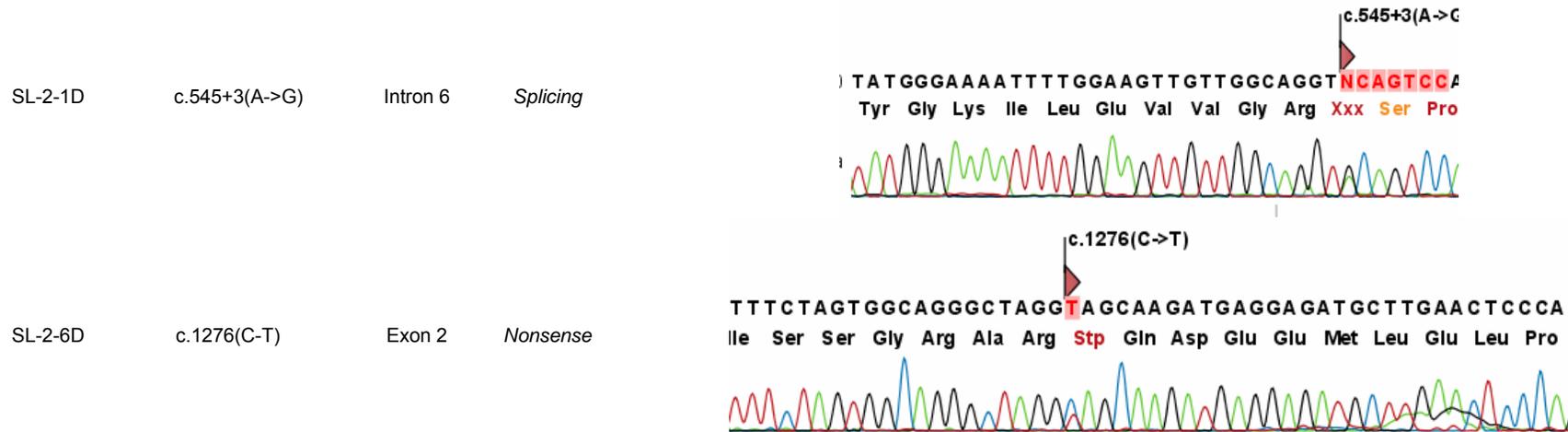
De acordo com a consulta nas bases de dados e na literatura, das 24 alterações encontradas no gene *MLH1*, 16 em 15 pacientes (15,2%) foram classificadas como patogênicas e estão apresentadas na Tabela 10, sendo duas delas interpretadas pelos programas de predição *Polyphen* e *SIFT* (Tabela 11).

Tabela 10 - Caracterização e representação das mutações patogênicas do gene *MLH1*.

ID PACIENTE	POSIÇÃO E DEFINIÇÃO DA MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE MUTAÇÃO	CROMATOGRAMA
SL-1D	c.545+3(A->G)	Intron 6	<i>Splicing</i>	<p style="text-align: right;">c.545+3(A->G)</p> <p>TATGGGAAAATTTTGGGAAGTTGTTGGCAGGTNCAGTCCAA Tyr Gly Lys Ile Leu Glu Val Val Gly Arg Xxx Ser Pro</p>
SL-1D	c.2152(C->T)	Exon 19	<i>Missense</i>	<p style="text-align: right;">c.2152(C->T)</p> <p>TTCCAAACTCCTGGAAGTGGACTGTGGAATACATTGTCTATAAAGCCTTGCGC le Pro Asn Ser Trp Lys Trp Thr Val Glu Tyr Ile Val Tyr Lys Ala Leu Arg</p>
SL-19D	c.2224(C->T)	Exon 19	<i>Nonsense</i>	<p style="text-align: right;">c.2224(C->T)</p> <p>TCACAGAAGATGGAAATATCCTGTAGCTTGCTAACCTGCCTGATCTATACAAAG he Thr Glu Asp Gly Asn Ile Leu Stp Leu Ala Asn Leu Pro Asp Leu Tyr Lys \</p> <p>TTCAGTACACAATGCAGGCATTAGTTTCTCAGTTAAAAAGNA x Ser Val His Asn Ala Gly Ile Ser Phe Ser Val Lys Lys Xxx</p>
SL-29D	c.588+2(T->A)	Intron7	<i>Splicing</i>	

SL-31D	c.791-6_793delgttagatc	Exon 10	Deleção	<p>Deleção</p> <p>CTCNTT NCNTTCTNTNGATCGTCTGGGTAGAATCAACTTCCTTGAGAAAAGCC (Ser Xxx Xxx Ser Xxx Asp Arg Leu Val Glu Ser Thr Ser Leu Arg Lys Ala</p>
SL-36D	c.2027(T->C)	Exon 18	Missense	<p>c.2027(T->C)</p> <p>AGAAAAGGAATGTTTTGAAAGCCCCAGTAAAGAATGCGCTATGTTCTATTCCA j Glu Lys Glu Cys Phe Glu Ser Pro Ser Lys Glu Cys Ala Met Phe Tyr Ser</p>
SL-54D	c.1853delA InsTTCTT	Exon 16	Deleção/ Inserção	<p>delA InsTTCTT</p> <p>ACATTGTTGAGTTTCTGAAGAAGA NNNNTGNNNNNN yr Ile Val Glu Phe Leu Lys Lys Xxx Xxx Xxx Xxx X</p>
SL-82D	c.2152(C->T)	Exon 19	Missense	<p>c.2152(C->T)</p> <p>CTGGACTGTGGAATTACATTGTCTATAAAGCCTTGCGCTCACACATTCTGCCTCCT, Trp Thr Val Glu Tyr Ile Val Tyr Lys Ala Leu Arg Ser His Ile Leu Pro Pro</p>

SL-92D	c.1975(C->T)	Exon 17	Nonsense	<p>c.1975(C->T)</p> <p>3GGACTGCCTATCTTCATTCTTTGACTAGCCACTGAGG'</p> <p>Gly Leu Pro Ile Phe Ile Leu Stp Leu Ala Thr Glu V</p>
SL-93D	c.2041 (G->A)	Exon 18	Missense	<p>c.2041(G->A)</p> <p>AGGAATGTTTTGAAAGCCTCAGTAAAGAATGCNCTATGTTCTATTCCATCCGG</p> <p>ys Glu Cys Phe Glu Ser Leu Ser Lys Glu Cys Xxx Met Phe Tyr Ser Ile Arg</p>
SL-94D	c.1459(C-T)	Exon 13	Nonsense	<p>c.1459(C->T)</p> <p>GTGGAAATGGTGGAAAGATGATTCCTGAAAGGAAATGACTGCAGCTTGTACCCCC</p> <p>Val Glu Met Val Glu Asp Asp Ser Stp Lys Glu Met Thr Ala Ala Cys Thr Pro /</p>
SL-97D	c.1639_1643dup TTATA	Exon 14	Duplicação	<p>DupTTATA</p> <p>TTGGCACAGCATCAAACCAAGTTATANNNTNNCNTCNNNNCNNNNCNNA</p> <p>Leu Ala Gln His Gln Thr Lys Leu Tyr Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx X</p>



Das 24 alterações descritas para o gene *MLH1*, 7 patogênicas e 2 não patogênicas não tinham sido descritas nas bases, sendo descritas pela primeira vez.

Duas mutações pontuais (do tipo *missense*) não descritas nas bases de dados nem na literatura foram interpretadas e caracterizadas quanto à patogenicidade mediante os programas *Polyphen* e SIFT (Tabela 11).

Tabela 11 - Predição da patogenicidade mediante os programas *in silico*, *Polyphen* e SIFT.

ID	POSIÇÃO	POLYPHEN		SIFT	
		PACIENTE	ALTERAÇÃO	ESCORE	CLASSIFICAÇÃO
SL-21D	c.779(T->G)	2.061	Provavelmente prejudicial	0	Intolerante
	L260R				
SL-67D	c.1820(T->A)	1.629	Eventualmente prejudicial	0	Intolerante
	L607H				

ID: Identificação do paciente.

Para a alteração do paciente SL-21D, localizada no c.779(T->G) ou L260R, o *Polyphen* (escore: 2.061) classificou-a como “provavelmente prejudicial” e o SIFT (escore:0) como “intolerante”.

O paciente SL-67D com a alteração localizada no c.1820(T->A) ou L607H apresentou um escore de 1.629 e 0 para o *Polyphen* e SIFT, respectivamente, a qual foi classificada como “eventualmente prejudicial” e “intolerante”.

A Tabela 12 apresenta os cromatogramas com suas respectivas mutações patogênicas nos pacientes SL-21D e SL-67D.

Tabela 12 - Representação das mutações patogênicas caracterizadas pelo *Polyphen* e SIFT no gene *MLH1*.

ID PACIENTE	POSIÇÃO DA ALTERAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE MUTAÇÃO	CROMATOGRAMA
SL-21D	c.779(T->G) L260R	Exon 9	<i>Missense</i>	<p>GCAA...CTTACGCTTCATCAACC Ala Asn Tyr Ser Val Lys Lys Cys Ile Phe Leu Arg Phe Ile Asn</p>
SL-67D	c.1820(T->A) L607H	Exon 16	<i>Missense</i>	<p>...GAGACATGCTGAATACATTGTTGAGTTTCTGAAG ...Gly His Ala Glu Tyr Ile Val Glu Phe Leu Lys</p>

Das 24 alterações no gene *MLH1*, três pacientes apresentaram dupla mutação para o gene, sendo o paciente SL-1D com duas mutações do tipo patogênico, o paciente SL-54D com uma mutação patogênica e outra não patogênica, e finalmente o paciente SL-2-9D que apresentou duas mutações não patogênicas .

4.4.4 Descrição de um polimorfismo frequente no exon 8 do gene *MLH1*

Outras alterações encontradas no gene *MLH1*, foi a presença de um único polimorfismo altamente frequente no exon 8 do gene *MLH1* em 45 pacientes, sendo descrito como c.655 A->G ou I219V. As bases de dados consideram como um polimorfismo não patogênico (Figura 14).

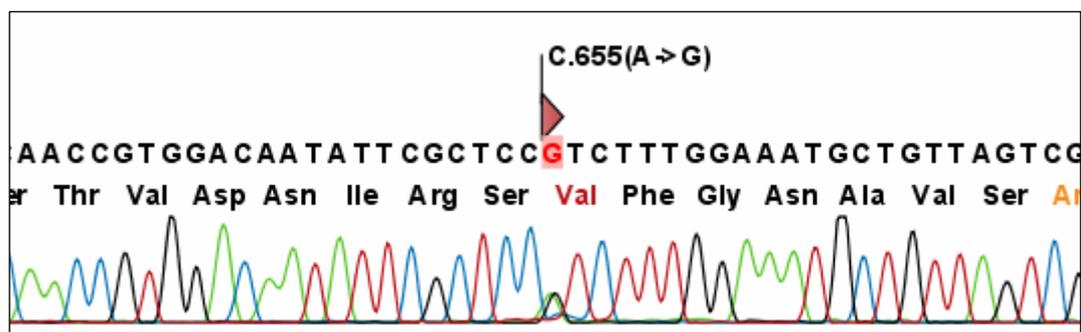


Figura 14 - Representação do polimorfismo no c.655(A->G) ou I219V no exon 8 do gene *MLH1*.

As frequências dos genótipos homozigotos selvagens (*Ile/Ile*), heterozigotos (*Ile/Val*) e homozigotos polimórficos (*Val/Val*) para o códon 219 foram 55%, 35% e 10% respectivamente (Tabela 13).

Tabela 13 - Frequência do polimorfismo I219V em pacientes com suspeita de SL.

POLIMORFISMO	GENÓTIPO	NUMERO/TOTAL (%)		
		PACIENTES	FREQUENCIA GENOTÍPICA	FREQUENCIA ALÉLICA
I219V	<i>Ile/Ile</i>	54/99	0,55	0,72
	<i>Ile/Val</i>	35/99	0,35	-
	<i>Val/Val</i>	10/99	0,1	0,28

Ile/Ile = homozigotos para o alelo selvagem; *Ile/Val* = heterozigotos; *Val/Val* = homozigotos para o alelo polimórfico.

A frequência alélica para o alelo polimórfico (Val) foi 0,28, similar à encontrada nas populações europeias e americanas (PELTOMAKI e VASEN 1997).

4.5 RASTREAMENTO DE MUTAÇÕES POR SEQUENCIAMENTO DIRETO NO GENE *MSH2*

4.5.1 Frequência dos tipos de alteração no gene *MSH2*

Dos 99 pacientes analisados para *MSH2* foram identificadas 22 alterações de pequena escala, sendo do tipo pontual (*missense*, *nonsense*, *splicing* e silenciosa), deleção e inserção em 21 pacientes não relacionados (21,1%).

Quando foi analisado o tipo de alteração mais frequente no gene *MSH2*, observou-se que o tipo pontual foi o mais frequente (86%), sendo representado por 10 *nonsense* (45,5%), 6 *missense* (27%), 1 *splicing* (4,5%),

2 silenciosas (9%), seguida dos tipos de deleção com 3 alterações (9,5%) e 1 inserção com uma frequência de 4,5%.

A frequência dos tipos de alteração encontrados no gene *MSH2* está apresentada na Figura 15.



Figura 15 - Frequência dos tipos de alterações no gene *MSH2*.

4.5.2 Frequência dos exons alterados no gene *MSH2*

Com base nas 22 alterações encontradas para o gene *MSH2*, foi possível calcular a frequência dos exons alterados.

O exon que apresentou maior frequência de alterações no gene *MSH2*, foi o exon 13 com 7 alterações (30%), seguida do exon 6 com 4 alterações (17,4%), do exon 9 com 3 alterações (13%), dos exons 1, 5 e 16 com 2 alterações cada (9% cada) e dos exons 11, 12 e 15 com uma alteração cada (4,5% cada).

A frequência dos exons afetados está apresentada na Figura 16.

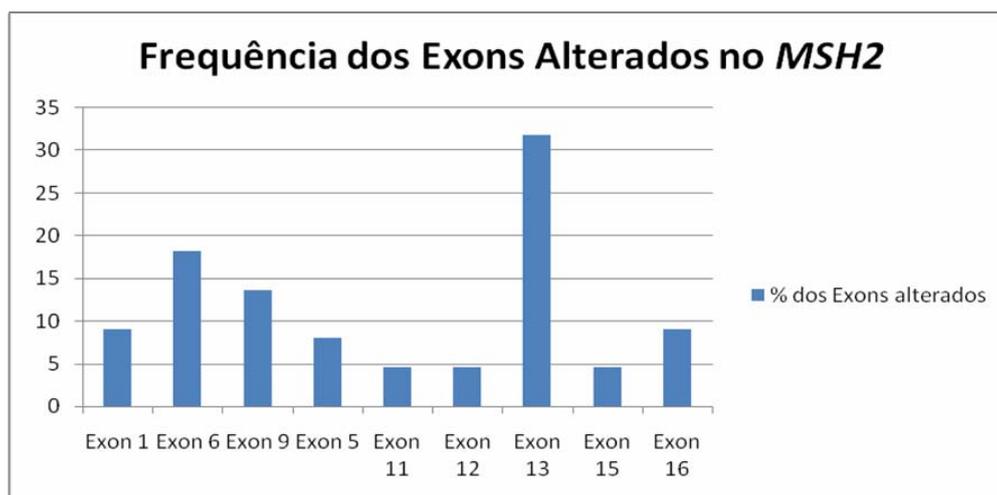


Figura 16 - Frequência dos exons afetados no gene *MSH2*.

4.5.3 Interpretação das mutações do gene *MSH2*

A caracterização e interpretação das 22 alterações encontradas no gene *MSH2* foram realizadas segundo as etapas descritas para o gene *MLH1*.

A Tabela 14 demonstra as características enquanto a posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, programas SIFT e *Polyphen*, e finalmente a classificação estabelecida no estudo das alterações encontradas no gene *MSH2*.

De acordo com a consulta nas bases de dados e na literatura, das 22 alterações encontradas no gene *MSH2*, 16 em 15 pacientes (15,2%) foram classificadas como patogênicas e estão apresentadas na Tabela 15, sendo uma delas interpretada pelos programas de predição *Polyphen* e SIFT.

Tabela 14 - Descrição da posição, localização, tipo, classificação segundo as bases de dados, literatura, SIFT e *Polyphen* das alterações encontradas no gene *MSH2*.

ID PACIENTE	POSIÇÃO E DEFINIÇÃO DA ALTERAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE ALTERAÇÃO	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A BASES DE DADOS CONSULTADAS	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO A LITERATURA	CLASSIFICAÇÃO SEGUNDO PROGRAMAS DE PREDIÇÃO SIFT E POLYPHEN	CLASSIFICAÇÃO DA ALTERAÇÃO NESSE ESTUDO
SL-4D	c.1447(G->T)	Exon 9	Nonsense	Desconhecida	-	-	Patogênica
SL-5D	c.2524_2525delAG	Exon 15	Deleção	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-6D	c.1447(G->T)	Exon 9	Nonsense	Desconhecida	-	-	Patogênica
SL-8D	c.1666del (T)	Exon 11	Deleção	Não descrita	Patogênica (DESAI et al. 2000)	-	Patogênica
SL-15D	c.2187(G->T)	Exon 13	Missense	Não descrita	-	Provavelmente prejudicial/Intolerante	Patogênica
SL-20D	c.2152(C->T)	Exon 13	Nonsense	Patogênica	Patogênica	-	Patogênica
SL-25D	c.2131(C->T)	Exon 13	Nonsense	Desconhecida	Patogênica (KURZAWSKI et al. 2002)	-	Patogênica
SL-27D	c.965(G->A)	Exon 6	Missense	Não Patogênica/Incerta	Não Patogênico/Incerta (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	Benigna/Tolerante	Não Patogênica
SL-38D	c.2152(C->T)	Exon 13	Nonsense	Patogênica	Patogênica (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	-	Patogênica
SL-39D	c.1967_1970dupACTT	Exon 12	Duplicação	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-40D	c.1444(A->T)	Exon 9	Nonsense	Não descrita	Foi descrita uma deleção ou duplicação de (A) nesse nt. (PELTÖMAKI et al. 1997)	-	Patogênica
SL-44D	c.2785 (C->T)	Exon 16	Nonsense	Não descrita	-	-	Patogênica
SL-44D	c. 942+3 (A->T)	Intron 5	Splicing	Desconhecida	Patogênica (ARNOLD et al. 2009)	-	Patogênica
SL-51D	c.965(G->A)	Exon 6	Missense	Não Patogênica/Incerta	Não Patogênico/Incerta (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	Benigna/Tolerante	Não Patogênica
SL-63D	c.23(C->T)	Exon 1	Missense	-	-	-	Não Patogênica
SL-63D	c.2802(G->A)	Exon 16	Missense	Desconhecida	Desconhecida	-	Não Patogênica
SL-72D	c.2152(C->T)	Exon 13	Nonsense	Patogênica	Patogênica (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	-	Patogênica
SL-74D	c.984(C->T)	Exon 6	Silenciosa	Desconhecida	-	-	Não Patogênica
SL-2-2	c.187delG	Exon 1	Deleção	Patogênica	Patogênica	-	Patogênica
SL-2-3D	c.2152(C->T)	Exon 13	Nonsense	Patogênica	Patogênica (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	-	Patogênica
SL-2-8D	c.984(C->T)	Exon 6	Silenciosa	Desconhecida	-	-	Não Patogênica
SL-2-9D	c.2152(C->T)	Exon 13	Nonsense	Patogênica	Patogênica (PELTÖMAKI E VASEN 1997)	-	Patogênica

ID: Identificação do Paciente; (-): Não aplicável

Tabela 15 - Caracterização e representação das mutações patogênicas do gene *MSH2*.

ID PACIENTE	POSIÇÃO DA MUTAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE MUTAÇÃO	CROMATOGRAMA
SL-4D	c.1447(G-T)	Exon 9	Nonsense	<p>c.1447 (G→T)</p> <p>TCCTAATCTCAGTGAATTAAGA TAAATAATGAATGACTTGAAAAAGA p Pro Asn Leu Ser Glu Leu Arg Stp Ile Met Asn Asp Leu Glu Lys I</p>
SL-5D	c.2524_2525delAG	Exon 15	Deleção	<p>DELEÇÃO</p> <p>GTAATAGNGTGNNNNANANANNNCNNNNNNNGNGNNGANTCNNNTATTC p Stp Stp Xxx Ile</p>
SL-6D	c.1447(G-T)	Exon 9	Nonsense	<p>c.1447 (G→T)</p> <p>TCCTAATCTCAGTGAATTAAGA TAAATAATGAATGACTTGAAAAAGA p Pro Asn Leu Ser Glu Leu Arg Stp Ile Met Asn Asp Leu Glu Lys I</p>
SL-8D	del1666(T)	Exon 11	Deleção	<p>del(A)</p> <p>VTTNNNNNNNNNNNAANTGACTTCTTTAAATGAAGACTATACCA Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Stp Leu Leu Stp Met Lys Ser Ile Pro</p>

SL-20D	c.2152(C>T)	Exon 13	Missense	<p>c.2152(C-T)</p> <p>GCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTNAATTGAAAGGAGTCTCCA Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr Val Asn Stp Lys Glu Ser Pro</p>
SL-25D	c.2131(C-T)	Exon 13	Missense	<p>c.2131(C->T)</p> <p>CAGCAGAAGTGTCCATTGTGGACTGCATCTTAGCCNGAGTAGGGGCTGGTGACA Gln Gln Lys Cys Pro Leu Trp Thr Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr</p>
SL-38D	c.2152(C-T)	Exon 13	Missense	<p>c.2152(C-T)</p> <p>GCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTNAATTGAAAGGAGTCTCCA Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr Val Asn Stp Lys Glu Ser Pro</p>
SL-39D	c.1967_1970dupACTT	Exon 12	Inserção	<p>LAGATGAAATTGCATTTATTCCTAATGACGTATACTTNNNNNNANAN</p> <p>Lys Met Lys Leu His Leu Phe Leu Met Thr Tyr Thr Xxx Xxx Xxx Xx</p>
SL-40D	c.1444(A-T)	Exon 9	Nonsense	<p>TCCTAATCTCAGTGAATTATGAGAAATAATGAATGACTTGAAAAGAAGA ip Pro Asn Leu Ser Glu Leu Stp Glu Ile Met Asn Asp Leu Glu Lys Lys M</p>
SL-44D	c.2785 (C->T)	Exon 16	Nonsense	<p>c.2805(C->T)</p> <p>TAGCTTTGTAATGAAATCATTTCTGAATAAAAGTTACTACGTGAAAAATC in Ser Phe Val Asn Glu Ile Ile Ser Stp Ile Lys Val Thr Thr Stp Lys Ile</p>

SL-44D	c.942+3(A->T)	Intron 5	Splicing	<p>c.942+3(A->T)</p> <p>AGTCAGAGCCCTTAACCTTTTTTCAGGTNAAAAAAAAA Ala Ser Glu Pro Leu Thr Phe Phe Arg Xxx Lys Lys I</p>
SL-72D	c.2152(C>T)	Exon 13	Missense	<p>c.2152(C-T)</p> <p>GCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTNAATTGAAAGGAGTCTCCA Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr Val Asn Stp Lys Glu Ser Pro</p>
SL-2-3D	c.2152(C>T)	Exon 13	Missense	<p>c.2152(C-T)</p> <p>GCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTNAATTGAAAGGAGTCTCCA Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr Val Asn Stp Lys Glu Ser Pro</p>
SL-2-2D	187delG	Exon 1	Deleção	<p>deleção</p> <p>3CCGCCCGGGAGGTGTTCAAGACCCANGGCNNNNNNANNNNNNGGGNCNC Pro Pro Gly Arg Cys Ser Arg Pro Xxx Gly Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx Xxx A</p>
SL-2-9D	c.2152(C>T)	Exon 13	Missense	<p>c.2152(C-T)</p> <p>GCATCTTAGCCCGAGTAGGGGCTGGTGACAGTNAATTGAAAGGAGTCTC Ala Ser Stp Pro Glu Stp Gly Leu Val Thr Val Asn Stp Lys Glu Ser I</p>

ID: Identificação do Paciente

Das 22 alterações descritas para o gene *MSH2*, 6 patogênicas não tinham sido descritas nas bases de dados, sendo descritas pela primeira vez no presente estudo.

Uma mutação pontual (do tipo *missense*) não descrita nas bases de dados nem na literatura foi interpretada e caracterizada quanto à patogenicidade mediante os programas *Polyphen* e SIFT (Tabela 16).

Tabela 16 - Predição da patogenicidade mediante os programas *in silico*, *Polyphen* e SIFT.

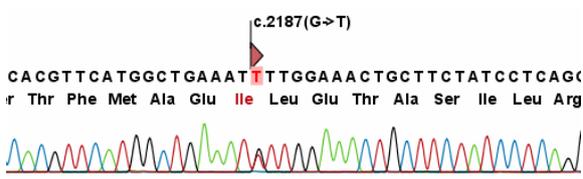
ID	POSIÇÃO	POLYPHEN		SIFT	
		Escore	Classificação	Escore	Classificação
PACIENTE	ALTERAÇÃO				
SL-15D	c.2187(G->T) M729I	2.293	Provavelmente prejudicial	0	Intolerante

ID: Identificação do paciente

O paciente SL-15D apresentou uma alteração pontual no c.2187(G->T) ou M729I. Segundo o *Polyphen* (escore: 2.293), foi classificada como “provavelmente prejudicial” e segundo o programa SIFT como “intolerante” (escore: 0), sendo classificada como mutação patogênica.

A Tabela 17 apresenta o cromatograma com a respectiva mutação patogênica no paciente SL-15D.

Tabela 17 - Representação da mutação no gene *MSH2* caracterizada pelo *Polyphen* e SIFT.

ID PACIENTE	POSIÇÃO ALTERAÇÃO	LOCALIZAÇÃO	TIPO DE MUTAÇÃO	CROMATOGRAMA
SL-15D	c.2187(G->T) M729I	Exon 13	Missense	 <p>c.2187(G->T)</p> <p>CACGTTTCATGGCTGAAATTTGGAAACTGCTTCTATCCTCAGC r Thr Phe Met Ala Glu Ile Leu Glu Thr Ala Ser Ile Leu Arg</p>

Das 22 alterações encontradas no gene *MSH2* em 21 pacientes, dois pacientes apresentaram dupla mutação para o gene, sendo o paciente SL-44D com duas mutações patogênicas e o paciente SL-63D apresentou duas mutações não patogênicas.

4.5.4 Descrição de dois polimorfismos frequentes no gene *MSH2*

Outras alterações encontradas no gene *MSH2*, foi a presença de dois polimorfismos intrônicos altamente frequentes, sendo um deles descrito como c.1661+12(G->A) no intron 10 (Figura 17).

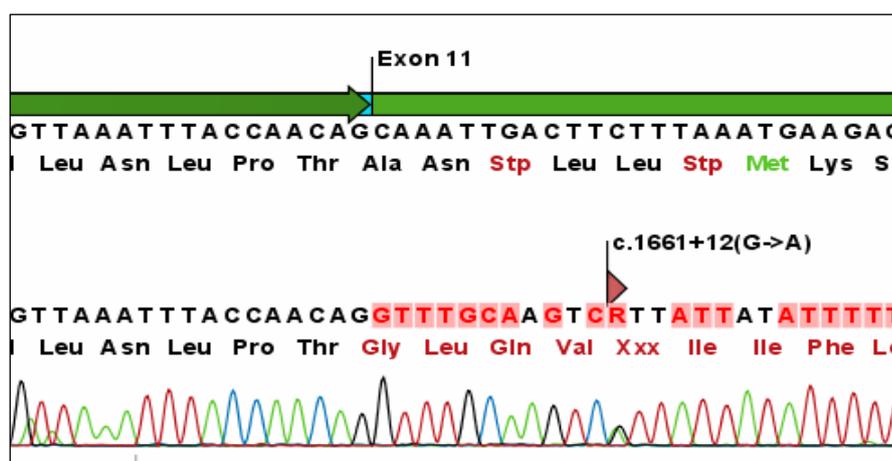


Figura 17 - Representação do polimorfismo no c.1661+12(G->A) no intron 10 do gene *MSH2*.

Quanto ao outro polimorfismo, encontrou-se no c.2006-6(T->C) no intron 12 do gene *MSH2* (Figura 18). As bases de dados consideram esses dois polimorfismos como não patogênicos.

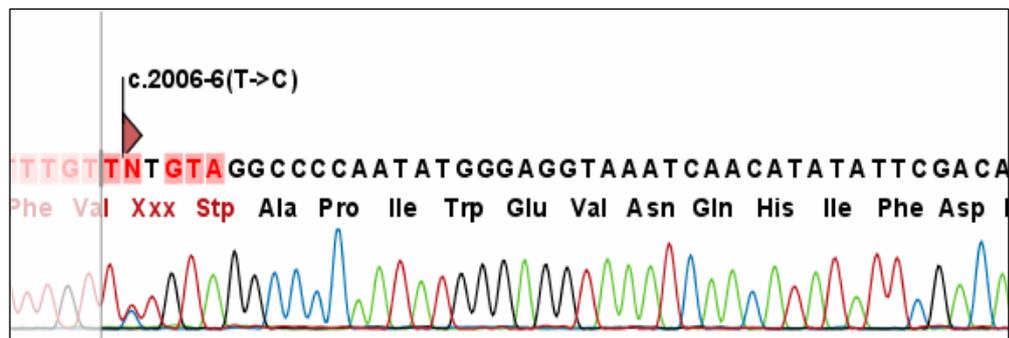


Figura 18 - Representação do polimorfismo no c.2006-6(T->C) no intron 12 do gene *MSH2*.

A Tabela 18 demonstra as frequências dos genótipos homozigotos selvagens (G/G), heterozigotos (G/A) e homozigotos polimórficos (A/A), sendo 79%, 21% e 0% respectivamente para o polimorfismo c.1661+12(G->A) no intron 10 do gene *MSH2*.

Quanto ao polimorfismo no c.2006-6(T->C) no intron 12 do gene *MSH2*, as frequências dos genótipos homozigotos selvagens (T/T), heterozigotos (T/C) e homozigotos polimórficos (C/C) foram de 85%, 15% e 0% respectivamente (Tabela 18).

Tabela 18 - Frequências dos polimorfismos c.1661+12(G->A) e c.2006-6 (T->C) no gene *MSH2* em pacientes com suspeita de SL.

POLIMORFISMO	GENÓTIPO	PACIENTES	NUMERO/TOTAL (%)	
			FREQUENCIA GENOTÍPICA	FREQUENCIA ALÉLICA
c.1661+12(G->A)	G/G	71/90	0,79	0,89
	G/A	19/90	0,21	-
	A/A	0/90	0,0	0,11
c.2006-6(T->C)	T/T	75/88	0,85	0,93
	T/C	13/88	0,15	-
	C/C	0/88	0	0,07

G/G, T/T = homocigotos para o alelo selvagem; G/A, T/C = heterocigotos; A/A, C/C = homocigotos para o alelo polimórfico.

A frequência alélica para o alelo polimórfico (A) foi 0,11 e para o (C) foi de 0,07, diferentes das encontradas na literatura.

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES NOS GENES *MLH1* E *MSH2* NO MESMO PACIENTE

Do total de pacientes que apresentaram alterações nos genes *MLH1* e *MSH2*, três apresentaram alteração nos dois genes, sendo que as alterações no gene *MLH1* descritas nestes pacientes foram não patogênicas. No entanto, das três mutações descritas para o gene *MSH2*, duas delas foram patogênicas.

A Tabela 19 demonstra os pacientes que apresentaram as alterações nos dois genes, assim como sua caracterização patogênica e seu critério clínico.

Tabela 19 - Representação dos pacientes com alteração nos dois genes *MLH1* e *MSH2*, caracterização patogênica das alterações e do critério clínico.

ID PACIENTE	<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	CRITÉRIO CLINICO
SL-38D	Não patogênica	Patogênica	Amsterdam I
SL-2-8D	Não patogênica	Não patogênica	Bethesda
SL-2-9D	Não patogênica	Patogênica	Bethesda

Dos três pacientes com alteração nos dois genes, nenhum deles apresentou duas mutações patogênicas no gene *MLH1* e no *MSH2*. Quanto aos critérios clínicos, dois preencheram os critérios de Bethesda e um, os critérios deAmsterdam .

4.7 CORRELAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES PATOGÊNICAS ENCONTRADAS NOS GENES *MLH1* E *MSH2* E O OS CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AMSTERDAM I/II BETHESDA

A Tabela 20 demonstra os 30 pacientes que apresentaram as 32 mutações patogênicas e os genes onde foram detectadas e seus respectivos critérios clínicos.

Tabela 20 - Correlação entre as mutações patogênicas dos genes *MLH1* e *MSH2* e os critérios clínicos nos pacientes com suspeita de SL.

ID PACIENTE	GENE	CRITÉRIO CLÍNICO
SL-1D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-19D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-21D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-29D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-31D	<i>MLH1</i>	Amsterdam II
SL-36D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-54D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-67D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-82D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-92D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-93D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-94D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-97D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-2-1D	<i>MLH1</i>	Amsterdam I
SL-2-6D	<i>MLH1</i>	Bethesda
SL-4D	<i>MSH2</i>	Bethesda
SL-5D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-6D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-8D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-15D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-20D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-25D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-38D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-39D	<i>MSH2</i>	Bethesda
SL-40D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-44D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-72D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-2-2D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-2-3D	<i>MSH2</i>	Amsterdam I
SL-2-9D	<i>MSH2</i>	Bethesda

ID: Identificação do paciente

Com base na tabela, pode se observar que nos 30 pacientes, o maior percentual encontrado em relação ao critério de inclusão foi o Amsterdam com 70% (21/30 pacientes) contra os 29% (9/30) de Bethesda.

Em relação ao total dos pacientes analisados nesse estudo (n=99), 51,2% dos pacientes Amsterdam apresentaram mutação patogênica nos genes *MLH1* ou *MSH2* enquanto, 15,5% dos Bethesda apresentaram mutação patogênica nesses genes.

4.8 COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES DE MSI, IHQ COM O SEQUENCIAMENTO DOS GENES *MLH1* E *MSH2*

As análises de MSI, IHQ e sequenciamento foram realizadas como parte do projeto sobre “Avaliação da Frequência de Mutações nos Genes do Sistema de Reparo de DNA em pacientes com suspeita de Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose: Estudo Colaborativo Sul-Americano”, financiado pela FAPESP com número 05/05155-6.

A fim de estabelecer uma comparação entre as mutações detectadas por sequenciamento completo nos dois genes com os resultados dos testes de MSI e IHQ, foram analisados dados de 19 pacientes previamente estudados, comuns aos dois projetos (OLIVEIRA 2008).

Os resultados obtidos de MSI foram classificados como: MSS (microssatélite estável) ou MSI-H (MSI alta); a IHQ foi descrita como positiva, quando teve a expressão das proteínas (*MLH1/PMS2* e *MSH2/MSH6*) e negativo quando um dos dímeros não teve expressão

protéica. A Tabela 21 demonstra a comparação entre os resultados do sequenciamento (mutações patogênicas) dos genes *MLH1* e *MSH2*, IHQ e MSI.

Tabela 21 - Comparação entre as análises de MSI, IHQ e sequenciamento dos pacientes com suspeita de SL.

ID PACIENTE	MSI	IHQ		Mutação Patogênica		Correlação dos Testes
		MLH1/PMS2	MSH2/MSH6	MLH1	MSH2	
SL-6D	MSI-H	+	-	-	c.1447(G->T)	SIM
SL-15D	MSS	+	+	-	c.2187 (G->T)	NÃO
SL-16D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-17D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-20D	MSI-H	+	-	-	c.2152(C->T)	SIM
SL-18D	MSI-H	-	+	-	-	SIM
SL-19D	MSS	+	+	c.2224(C->T)	-	NÃO
SL-25D	MSI-H	+	-	-	c.2131(C->T)	SIM
SL-42D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-44D	MSI-H	+	-	-	c.942+3(A->T) c.2805(C->T)	SIM
SL-52D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-53D	MSI-H	Negativo no MLH1	+	-	-	NÃO
SL-55D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-56D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-59D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-64D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-65D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-68D	MSS	+	+	-	-	SIM
SL-72D	MSI-H	+	-	-	c.2152(C->T)	SIM

ID: Identificação do paciente; MSI-H: MSI Alta, MSS: microssatélite estável; (+): expressão do dímero de proteínas; (-): não expressão do dímero de proteínas, SIM: concordância entre os testes, NÃO: não concordância entre os testes.

Dos 19 pacientes analisados para MSI, IHQ e sequenciamento, 16 (79%) pacientes apresentaram uma concordância entre as três análises, no entanto, 3 (21%) pacientes não apresentaram essa concordância.

5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NOS GENES *MLH1* E *MSH2*

De acordo com a base de dados do InSIGHT e as outras bases de dados consultadas, a maioria das mutações no gene *MLH1*, são do tipo pontual. São as alterações *missense* (24%-30%), *splicing* (13%), *nonsense* (7%), silenciosa (9%) e as pequenas inserções e deleções (22%) (MMR 2009, InSIGHT 2009).

Os resultados encontrados para o gene *MLH1* em nosso estudo foram similares aos das bases de dados consultadas e da literatura.

Nesse estudo, o gene *MLH1* apresentou a alteração tipo *missense* (42%) como mais frequente, seguida da *nonsense* (15%), *splicing* (15%) e pequenas deleções (11%) ou inserções (8%). Existem evidências de que as mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* são principalmente do tipo pontual, que incluem as *missense*, *nonsense*, *splicing* e silenciosas (ROULEAU et al. 2009, SJÖBLOM et al. 2007). A frequência de mutações do tipo *missense* é mais alta no gene *MLH1* do que no gene *MSH2*, sendo que algumas delas conduzem à perda da atividade enzimática de *MLH1*. Tais mutações são de difícil interpretação e mais propensas de serem patogênicas quando ocorrem nos domínios de interação entre *MLH1* e *PMS2* ou entre os heterodímeros *MutS* e *MutL*. Sua interpretação requer

informação da historia familiar ou de estudos funcionais (BOLAND et al. 2008).

Quanto ao gene *MSH2*, as alterações mais freqüentes, segundo as bases de dados também são o tipo pontual, que incluem as *missense* (18%), *nonsense* (10%), *splicing* (6%), silenciosas (9%) e as pequenas inserções ou deleções (25%) (WEI et al. 2003, MMR 2009).

Nossos resultados foram similares aos encontrados nas bases de dados e na literatura. Porém, verificamos diferenças entre seus subtipos *nonsense* e *missense*. Na nossa casuística, o tipo *nonsense* foi o mais frequente (45,5%), seguido do tipo *missense* (27%). Estes resultados foram similares aos do estudo realizado por PELTOMÄKI e VASEN (1997), onde também foi descrita uma alta proporção de mutações do tipo *nonsense* no gene *MSH2* (APESSOS et al. 2005).

Uma possível explicação para a diferença entre os subtipos é a grande quantidade de alterações ainda não descritas 6/22 (27%) no gene *MSH2*, encontradas em nosso estudo. Essas alterações foram do tipo pontual (1 *missense* e 2 *nonsense*) assim como duas deleções e uma inserção. Entretanto, são necessários estudos funcionais para determinar sua patogenicidade, uma vez que as mutações do tipo *missense* frequentemente apresentam uma discutível relevância (YU et al. 2009).

A frequência dos exons nos genes *MLH1* e *MSH2* encontradas no nosso estudo também foram relativamente semelhantes às encontradas na base de dados (MMR 2009).

Em relação à proporção de mutações, encontramos 32 mutações patogênicas em 30 pacientes, sendo 16 no gene *MLH1* e *MSH2* (15,2% cada).

Nossos resultados foram similares aos encontrados em famílias da América do Norte e da Europa, sugerindo uma proporção similar para os dois genes. Mutações no gene *MLH1* foram descritas em 24% (8/34) em famílias japonesas com suspeita de SL, enquanto a proporção atribuível ao gene *MSH2* em famílias alemãs e norteamericanas foi de respectivamente 21% (7/34) e 34% (10/29) (NYSTRÖM-LAHTI et al. 1996).

Outros estudos mostraram uma predominância de mutações deletérias no gene *MLH1* sobre o gene *MSH2*. YAP et al. (2009) reportaram 13 mutações, sendo uma delas no gene *MSH2*, e 12 no gene *MLH1*. Resultados similares foram reportados por SHIN et al. (2004) e LIU et al. (2004), apresentando uma predominância similar do gene *MLH1* sobre o gene *MSH2* em famílias coreanas e chinesas. Entretanto, resultados diferentes foram encontrados por BAI et al. (1999) em famílias japonesas Amsterdam positivas, onde reportaram a predominância das mutações do gene *MSH2* sobre o *MLH1* (11 vs 1). APESSOS et al. (2005) encontraram 77,7% das mutações no gene *MSH2*. Embora tenha sido um estudo pequeno em 9 famílias gregas, esse achado contrasta com os descritos previamente.

Um dos prováveis fatores que poderia influenciar no predomínio das mutações do gene *MSH2* sob o *MLH1* seria o tipo de população estudada, visto que esses estudos foram realizados em populações asiáticas. No

Brasil, seria difícil prever qual o gene é preponderante diante das variações étnicas da população brasileira (ROSSI et al. 2002).

Este é o segundo estudo que avalia mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* em pacientes brasileiros com suspeita de SL, o primeiro foi publicado por ROSSI et al. (2002) com 2 mutações no gene *MSH2* e 8 no gene *MLH1*. Novas alterações intrônicas no gene *MLH1* estão também descritas em famílias brasileiras (DOMINGUEZ et al. 2008 – Anexo 4).

5.2 INTERPRETAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO GENE *MLH1*

As mutações do tipo pontual (*splicing* e *nonsense*), inserção e deleção que produzem truncamento de proteínas são consideradas patogênicas (KRÜGER et al. 2004). A maioria das mutações que afetam o sítio de *splicing* é mais comum no gene *MLH1* e constituem um terço de todas as mutações germinativas deste gene (RENKONEN et al. 2004).

De acordo com essas informações, além das contidas nas bases de dados, interpretamos 15 mutações (aproximadamente 15,2%) como patogênicas. Destas, sete classificadas como patogênicas ainda não foram descritas na literatura até o momento. Portanto, estas mutações são apresentadas pela primeira vez neste trabalho. Entretanto, sugere-se a realização de estudos funcionais ou análise de segregação da alteração para confirmar sua patogenicidade.

A mutação c.2152 (C->T) encontrada nos pacientes SL-1D e SL-82D foi publicada pela primeira vez por KOWALSKI et al. (1997). Trata-se de uma

transição C->T no códon 718 que produz uma troca do aminoácido histidina (H) para tirosina (Y) no domínio C-terminal da proteína MLH1. Sabe-se que o domínio C-terminal da proteína MLH1 é requerido para sua dimerização com PMS2, o qual está envolvido no reconhecimento de erros no DNA. Estudos preliminares revelam uma redução de 80% da capacidade de dimerização de MLH1 quando seu domínio C-terminal estiver afetado. Isso poderia explicar a patogenicidade desta mutação na SL (GOMEZ et al. 2009). Essa mutação foi relatada pela primeira vez em duas famílias brasileiras não relacionadas por ROSSI et al. (2002). No entanto, embora essa mutação tenha sido relatada na literatura, há poucas informações adicionais a respeito (GOMEZ et al. 2009).

HUTTER et al. (1998) identificaram pela primeira vez uma alteração no c.2146(G->A) ou V716M encontrada no paciente SL-2-9D. CERDEQUIST et al. (2004) encontraram esta mutação juntamente com outra mutação patogênica em um paciente com dois tumores primários metacrônicos, e a definiu como uma UV. O AA nessa posição não é evolutivamente conservado e tem sido encontrado em aproximadamente 1% dos controles normais na *Myriad Genetic Laboratories*. A frequência alélica desta variante foi de 1% nos indivíduos controles. Portanto, esta variante foi classificada como um raro polimorfismo no gene *MLH1* (KÁMORY et al. 2006).

Os pacientes SL-1D e SL-2-1D apresentaram uma alteração no intron 6 na posição c.545+3 (A->G). Essa alteração tem sido amplamente estudada quanto a sua caracterização patogênica, visto sua proximidade do sítio de *splicing*. PENSOTTI et al. (1997) relataram como uma mutação patogênica

que produz um *partial skipping* do exon 6 no gene *MLH1*. Assim sendo, caracterizou-a como patogênica.

O paciente SL-2-8D apresentou uma alteração no último nucleotídeo do exon 8 (c.677 A->T). Esta transversão foi classificada como uma alteração *missense* (R226L). No entanto, sua localização próxima ao sítio de *splicing* 3' poderia sugerir a perda do exon 8 no gene *MLH1* (ZAVODNA et al. 2006). PELTOMÄKI e VASEN (1997) a descreveram como um defeito de *splicing*. Diante desses fatos, realizou-se a análise *in silico* para prever sua patogenicidade, e, assim sendo, classificou-a como uma alteração *missense* não patogênica. Entretanto, a real significância clínica das alterações do tipo *missense* nos genes de reparo de DNA são difíceis de avaliar na ausência de ensaios funcionais (PARK et al. 2008).

O paciente SL-38D apresentou uma deleção e uma inserção que produzem alteração no códon 618 de aa para gc, permitindo a troca de uma lisina (K) para uma alanina (A). Esta alteração foi descrita pela primeira vez em uma família americana e caracterizada como não patogênica (PELTOMÄKI e VASEN 1997).

O paciente SL-92D caracterizou-se por apresentar uma mutação do tipo *nonsense* no códon 659 na posição 1975 onde troca C->T e como consequência produz uma troca de arginina (R) para um códon de parada (*stop*). Esta mutação foi relatada pela primeira vez em famílias americanas e finlandesas por PELTOMÄKI e VASEN (1997). Quanto a sua patogenicidade, a base de dados a classifica como desconhecida, mas há fortes evidências na literatura que a caracterizam como patogênica pela

consequência que produz: deleção do exon 17 no gene *MLH1* (PELTOMÄKI e VASEN 1997).

O paciente SL-93D apresentou uma mutação no códon 681 na posição 2041 onde troca G->A e como consequência produz uma troca de alanina (A) para uma treonina (T). Essa mutação foi relatada pela primeira vez em uma família do Reino Unido (PELTOMÄKI e VASEN 1997) e, com base nas análises *in silico* e ensaios funcionais, foi caracterizada como patogênica.

A mutação *nonsense* no c.2224 (C->T) do paciente SL-19D não foi descrita nas bases de dados consultadas ou na literatura, tendo sido descrita pela primeira vez neste trabalho. No entanto, nessa posição foi descrita uma deleção (c.2224delC) do tipo patogênica (InSIGHT 2009). Caracterizamos essa mutação como patogênica.

Encontramos a presença de um polimorfismo altamente frequente no exon 8, na posição 655 do códon 219 (I219V), com uma frequência alélica de 28%, igual aquela encontrada por ROSSI et al. (2002) em pacientes brasileiros com suspeita de SL. Esse polimorfismo apresenta uma frequência alélica de 13% a 34% (NYSTRÖM-LAHTI et al. 1996). Foi descrito por PELTOMÄKI e VASEN (1997), que observaram uma frequência de 31%. Outros autores encontraram uma frequência alélica de 36% em indivíduos controles e em pacientes que apresentaram alta MSI (BERGINC et al. 2009). Entretanto, têm sido descritas frequências menores (aproximadamente 12%) que as mencionadas anteriormente (TANG et al. 2009). Estudos funcionais caracterizaram esse polimorfismo como benigno, e atualmente, é usado

como controle positivo para interpretação da patogenicidade das UVs (OU et al. 2008).

A taxa de mutações encontradas no gene *MLH1* pode ser afetada pela hipermetilação de seu promotor, o qual não foi analisado no presente trabalho, e à presença de rearranjos genômicos que compreendem um ou mais exons inteiros. O intron 6 do gene apresenta a maior porcentagem de sequências Alu (42%), caracterizando, portanto, um possível ponto de quebra (4,46/Kb), que pode provocar o rearranjo na região adjacente.

5.3 INTERPRETAÇÃO DAS MUTAÇÕES NO GENE *MSH2*

No gene *MHS2*, 16 mutações (15,2 %) foram classificadas como patogênicas. Foram consultadas as bases de dados anteriormente descritas. Para as mutações do tipo *missense* não descritas, realizou-se as análises *in silico* para predição de patogenicidade.

O paciente SL-44D apresentou a transversão A->T no nucleotídeo 942+3 no intron 5. Esta mutação foi caracterizada como fundadora no Canadá (Newfoundland). Entretanto, estudos analisando o haplótipo comum em 10 portadores desta variante em diferentes etnias, concluíram que esta mutação pode ter surgido *de novo*. Esse exemplo mostra que a frequência de mutações é o resultado tanto da probabilidade de uma mutação como da história demográfica da população estudada (MITCHELL et al. 2002). No Brasil, diferentemente da Europa, é muito difícil determinar a origem exata das famílias, pela heterogeneidade racial determinada pela miscigenação

racial, proporcionada tanto pela migração portuguesa e italiana assim de negros da África, e índios brasileiros nativos (ROSSI et al. 2002).

Segundo as bases de dados, esta mutação c.942+3 (A->T) representa 11% de todas as mutações germinativas no gene *MSH2*, sendo considerada como a mutação *de novo* mais comum e recorrente nessa população (DESAI et al. 2000). Essa alta incidência da mutação no gene levou à realização de vários estudos funcionais, que a descreveram como uma variante que produz a deleção do exon 5 devido ao *splicing* anormal codificando uma proteína alterada, com perda de 50 AA no resíduo 265-314 (TANG et al. 2009, PELTOMÄKI e VASEN 1997). Recentemente, ARNOLD et al. (2009), utilizando métodos mais sensíveis e específicos para o estabelecimento da patogenicidade das aberrações de *splicing*, classificaram esta variante como patogênica.

O paciente SL-8D caracterizou-se por apresentar uma deleção de uma base (T) no c.1666 (c.1666delT) ou no códon 555 do exon 11. Ao consultar as bases de dados, observamos a descrição de uma transição de T->C nesse nucleotídeo. Na literatura encontramos um único estudo (DESAI et al. 2000) descrevendo essa deleção como patogênica, tendo em vista a formação do códon de parada e conseqüente, a produção de uma proteína truncada com função insuficiente.

O paciente SL-25D apresentou uma alteração no exon 13 no c.2131 C->T resultando em uma substituição de arginina (R) no códon 711 por um códon de parada (*stop*) (R711X). Essa alteração foi descrita pela primeira vez por KURZAWSKI et al. (2002) como uma mutação patogênica.

Os pacientes SL-27D e SL-51D apresentaram a alteração c.965 (G->A) no códon 322, que altera uma glicina (G) para um aspartato (D). Esta alteração foi descrita pela primeira vez por PELTOMÄKI e VASEN (1997) em uma família russa e foi caracterizada como uma variante não patogênica, apresentando uma frequência alélica de 3% (NYSTRÖM-LAHTI et al. 1996, OLILLA et al. 2008).

Nas nossas análises, encontramos um polimorfismo no intron 12 no c.2006-6T->C com uma frequência alélica de 0,07. A frequência encontrada mostrou-se baixa em relação aos resultados de TANG et al. (2009) na população taiwanesa (0,222). O impacto desta alteração intrônica na patogênese do câncer ainda é controverso, embora tenha sido associada com um incremento no risco de CCR em pacientes com colite ulcerativa (TANG et al. 2009). No entanto, ao ser estudada em pacientes com suspeita de SL, tem sido classificada como um simples polimorfismo (PARK et al. 2008).

Outra alteração intrônica encontrada no presente trabalho foi no c.1661+12G->A (intron 10) com uma frequência alélica de 0,11. A frequência encontrada por nós mostrou-se relativamente baixa quando foi comparada com as frequências alélicas de 0,272 e 0,25 descritas por TANG et al. (2009) e PELTOMÄKI e VASEN (1997) respectivamente. No entanto, nossa frequência foi alta ao ser comparada com aquelas encontradas em outro estudo realizado por BERGINC et al. (2009) em indivíduos controles (0,07) e em indivíduos que apresentaram uma alta MSI (0,05).

A taxa de mutação do gene *MSH2* pode ser afetada pela presença de grandes deleções que compreendem um exon ou mais, que afetam principalmente o gene *MSH2*. Segundo CHARBONIER et al. (2002) os rearranjos que afetam os primeiros exons do gene *MSH2* ocorre devido à alta densidade das sequências Alu nos primeiros introns (MARTÍNEZ-BOUZAS et al. 2007). Também pode ocorrer pela presença de mutações na região promotora do gene. YAN et al. (2007) identificaram uma nova mutação germinativa, na sequência consenso E1A-F do promotor do gene *MSH2*, em uma família Amsterdam I, sendo caracterizada como patogênica. Outra possibilidade que não podemos descartar é o envolvimento de genes pouco descritos na SL, como o gene *PMS2* (AISSI-BEN MOUSSA et al. 2008). Um estudo realizado por TRUNINGER et al. (2005) demonstraram 6 mutações deletéreas no gene *PMS2* em 1.048 pacientes não selecionados. HENDRIKS et al. (2006b) também encontraram 7 mutações no gene *PMS2* em 120 famílias suspeitas de SL. Todas essas mutações encontradas no gene *PMS2* correspondiam a pacientes que apresentaram MSI.

Um trabalho recentemente desenvolvido por KOVACS et al. (2009) reportaram 5 novas deleções compreendendo a região 3' do gene *TACSTD1* (transdutor de sinal de cálcio 1 associado ao tumor), também conhecido como EpCam (molécula de adesão celular epitelial), localizado 17kb *upstream* no gene *MSH2*. As cinco famílias afetadas preencheram os critérios clínicos para a SL, e suas amostras tumorais apresentaram uma alta MSI e perda de IHQ para o gene *MSH2*. Esse resultado, associado à falta de mutação pontual na região codificadora do gene *MSH2*, indica

fortemente a existência de deleções patogênicas *upstream* descritas nesse novo gene, o *TACSTD1* (KOVACS et al. 2009).

5.4 IDENTIFICAÇÃO DE DUAS ALTERAÇÕES NOS GENES *MLH1* OU *MSH2* E NO MESMO PACIENTE

Alguns resultados interessantes foram encontrados no presente estudo, tal como mais de uma alteração no mesmo gene, *MLH1* ou *MSH2*, assim como alterações nos dois genes, no mesmo paciente.

No gene *MLH1*, foram identificadas três duplas alterações, sendo que duas delas foram encontradas em pacientes Amsterdam (SL-1D com as duas mutações do tipo patogênico, e SL-54D com uma mutação patogênica e a outra não patogênica), e a terceira em um paciente Bethesda (SL-2-9D) que apresentou as duas alterações do tipo não patogênica. Ao consultarmos a literatura, encontramos um trabalho descrito por PISTORIUS et al. (2007) identificando um paciente com dupla mutação consistindo de uma deleção no exon 15 e uma transição c.1853 A->G (p.K618R) no gene *MLH1*. Entretanto, ao realizar ensaios de alelo específico, mostrou-se que ambas as mutações se encontravam no mesmo alelo (PISTORIUS et al. (2007).

Para o gene *MSH2*, foram identificadas duas duplas alterações, sendo uma paciente Amsterdam (SL-44D) e outra em paciente Bethesda (SL-63D), que também apresentou as duas alterações não patogênicas. Não encontramos trabalhos descrevendo essas alterações, portanto, sugere-se

um estudo funcional assim como estudos de segregação dessas alterações nas famílias afetadas.

Ao comparar os resultados nos dois genes *MLH1* e *MSH2*, observamos a presença de três pares de alterações, sendo que duas (SL-38D e SL-2-9D) apresentaram patogenicidade no gene *MSH2*. Nosso resultado foi similar ao encontrado por KÁMORY et al. (2006) que descreveram uma alteração não patogênica no gene *MLH1* e uma outra patogênica no gene *MSH2* em uma família húngara.

Até o momento, poucos trabalhos reportaram a presença de duas alterações nos genes *MLH1* e *MSH2* no mesmo paciente. TANG et al. (2009) reportaram recentemente duas alterações (*MLH1* c.793C->T) e (*MSH2* c.2516 A->G) em uma família taiwanesa. Com base nos resultados dos heredogramas, os autores sugeriram que essas mutações encontravam-se em cromossomos diferentes.

Portanto, sugere-se para esse tipo de alteração um estudo molecular mais específico, assim como estudo de segregação da alteração na família.

5.5 INTERPRETAÇÃO DA PATOGENICIDADE DAS ALTERAÇÕES NOS GENES *MLH1* E *MSH2*

Um grande desafio no manejo clínico de pacientes na SL é a ocorrência de mutações do tipo *missense* sem caracterização de patogenicidade (OLILLA et al. 2006). Devido à grande incidência dessas variantes não classificáveis ou UVs, estão sendo estudados os defeitos

causados por uma mutação *missense* nos genes de reparo de DNA mediante estudos funcionais que analisam a inativação da atividade enzimática (hidrólises/ligação ATP), ou a interação defeituosa do complexo proteína-proteína. Também está sendo estudada a ligação defeituosa do complexo DNA-proteína, a localização sub-celular defeituosa das proteínas de reparo e, finalmente, a expressão e estabilidade alterada das proteínas de reparo de DNA (OLILLA et al. 2006).

Tendo em vista o atual crescimento no número das variantes *missense*, recentemente foi desenvolvida uma Base de Dados de UVs dos genes de reparo de DNA pelo Centro Médico da Universidade de Groningen. Essas bases contêm dados sobre os testes funcionais dessas variantes, tipo de mutação, fenótipo clínico observado, história familiar, análise patológica do tumor (MSI e IHQ), frequência das variantes detectadas em controles, segregação da variante dentro da família, conservação evolucionária, tipo de ensaio funcional utilizado, e, finalmente, resultado das análises utilizando esses ensaios (GREENBLAT et al. 2008).

Em nossos resultados encontramos três mutações do tipo *missense* nos genes *MLH1* ou *MSH2* não descritas na literatura. Ao serem analisados por programas *in silico* demonstraram alto grau de patogenicidade. No entanto, são necessários estudos da expressão das proteína MLH1/MSH2 mediante IHQ, a análise da co-segregação desta variante na família, assim como seu estudo em indivíduos controles; análises funcionais complementariam os dados clínicos para o estabelecimento da patogenicidade da variante questionada (LÜTZEN et al. 2008).

No entanto, um grande problema dos estudos funcionais é sua baixa sensibilidade e especificidade, fazendo-se necessária sua associação com a informação genética do indivíduo analisado (OU et al. 2007).

O melhor rastreamento para determinar a função das UVs ainda está sob debate. Até o momento, sistemas celulares humanos e de levedura estão sendo utilizados para a determinação de suas diferentes propriedades bioquímicas (OU et al. 2008).

Outra alternativa seria o uso de modelos de predição de mutações, os quais recentemente têm sido usados para quantificar o risco de o paciente ser portador de uma mutação e incrementar a taxa de identificação de pacientes com SL. No entanto, sua utilidade na população geral ainda precisa ser avaliada (BYFIELD e SYNGAL 2008).

Os três principais modelos de predição de mutações atualmente disponíveis são o de PREMM, Bartneson e MMRPro.

O modelo de PREMM foi desenhado por BALMAÑA et al. (2006) para predizer as mutações nos genes *MLH1/MSH2* em uma coorte de indivíduos com um risco moderado-alto de apresentar SL. Esse modelo apresenta um índice de concordância de 0,80 com uma sensibilidade de 5% e uma especificidade de 29%.

Em contraste, o modelo de predição de Bartneson foi desenvolvido para indivíduos com idade mais jovem, tendo como base uma coorte de CCR, para identificar baseiam-se na análise de regressão logística que considera a história pessoal e familiar, e está disponível na internet (BALMAÑA et al. 2008).

O modelo MMRpro, desenhado por CHEN et al. (2006), é uma ferramenta bayesiana que imita um padrão autossômico dominante de herança tendo como base parâmetros de prevalência das mutações nos genes *MLH1/MSH2/MSH6* e nos valores preditivos das características moleculares do tumor. Considera a história pessoal e familiar de CCR e de neoplasia de endométrio, e o dado de MSI. Esse modelo está disponível na internet e sem custo (BALMAÑA et al. 2008, POUCHET et al. 2009). Ele apresenta um índice de concordância de 0.79 e uma razão observada para casos preditos de 0,97 (BACKES et al. 2009).

Esses modelos foram desenvolvidos em diferentes populações, mas ainda não foram comparados (BALMAÑA et al. 2008). BALMAÑA et al. 2008 demonstraram que os modelos PREMM e Bartneson oferecem uma aproximação sistemática quantitativa para selecionar pacientes com CCR para a identificação de portadores de mutação nos genes *MLH1/MSH2*.

5.6 CORRELAÇÃO ENTRE AS MUTAÇÕES PATOGÊNICAS ENCONTRADAS NOS GENES *MLH1* E *MSH2* E O OS CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AMSTERDAM I/II E BETHESDA

Historicamente, o diagnóstico da SL baseia-se no histórico pessoal e familiar de câncer. Os critérios de Amsterdam definem de maneira clássica a SL, mas são considerados como restritos e pouco sensíveis (BOLAND et al. 1998). Os critérios de Bethesda, principalmente depois revisados, foram

desenvolvidos, por sua alta sensibilidade, para selecionar pacientes candidatos à análise de MSI (BYFIELD e SYNGAL 2008).

No presente trabalho, observou-se que as mutações dos genes *MLH1* e *MSH2* foram encontradas em 51,2% dos pacientes que preencheram os critérios de Amsterdam I e II, e em 15,5% para Bethesda.

Nossos resultados foram similares aos de TANG et al. (2009), que detectaram 66% de mutações patogênicas em 93 famílias taiwanesas não relacionadas que preencheram os critérios de Amsterdam.

Outros autores apresentaram uma frequência maior, como ROBINSON et al. (2007), com 88% de mutações nos genes de MMR entre os pacientes que preencheram os critérios de Amsterdam e tiveram MSI nos tumores. Assim, também observaram que 59% dos pacientes que não preencheram os critérios de Amsterdam e com MSI apresentaram mutações nos genes de MMR. Portanto, os critérios de Bethesda selecionaram todos os pacientes com mutação positiva para serem testados por IHQ e MSI (ROBINSON et al. (2007).

Quanto aos critérios de Bethesda, nossa frequência encontrada foi maior que aquela encontrada por PINOL et al. (2005), que analisaram 287 pacientes (23,5%) que preenchiam os critérios de Bethesda, dos quais 91 pacientes (7,4%) apresentaram MSI e perda de expressão das proteínas de reparo, e somente 11 pacientes (0,9%) apresentaram mutações germinativas nos genes *MLH1* ou *MSH2*, sendo diagnosticados como pacientes com SL.

Resultados similares foram encontrados por YEARSLEY et al. (2006), ao estudarem 482 pacientes americanos com CCR, dos quais, 87 (18%) eram portadores de MSI e somente 12 casos (2,5%) apresentaram mutação germinativa nos genes de reparo. Entretanto, outro estudo realizado por NIESSEN et al. (2006) encontrou taxas de mutações germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* em portadores de MSI de 82% (JIN et al. 2008). Estes resultados poderiam ser explicados pela seleção de casos e sensibilidade dos métodos utilizados.

Nossos resultados foram concordantes aos descritos na literatura, no que concerne a metodologia de sequenciamento automático como uma técnica eficaz na detecção de alterações pontuais e de pequenas deleções, inserções ou duplicações nos genes *MLH1* e *MSH2* (KURZAWSKI et al. 2002).

5.7 COMPARAÇÃO DAS ANÁLISES DE MSI, IHQ COM O SEQUENCIAMENTO DOS GENES *MLH1* E *MSH2*

Embora não seja um dos objetivos do presente trabalho, mas devido à disponibilidade dos resultados das análises de IHQ e MSI, os resultados destas duas metodologias foram comparados com os de sequenciamento direto em 19 pacientes.

Dos 19 pacientes analisados para MSI, IHQ e sequenciamento, 21% deles não apresentaram concordância entre as três metodologias, sendo os pacientes SL-15D, SL-19D e SL-53D.

O paciente SL-53D apresentou alta MSI e falta de expressão dos dímeros MLH1/PMS2 pela IHQ. O resultado do sequenciamento direto para o gene *MLH1* foi negativo. O padrão de expressão de IHQ na ausência da coloração dos dímeros MLH1 e PMS2 e coloração positiva para MSH2 e MSH6 é um indicativo de mutação no gene *MLH1*. Na ausência de MLH1, o heterodímero desta proteína com PMS2 não será formado, portanto, a proteína PMS2 pode ser rapidamente degradada, e, ambas as proteínas não são detectadas na IHQ (HENDRIKS et al. 2006a).

Uma explicação possível para a não correlação dos testes no paciente SL-53D é que a ausência de coloração para *MLH1* na IHQ pode também ser causada pela hipermetilação da região promotora do gene *MLH1*, um evento epigenético restrito ao tumor e independente de uma mutação germinativa no *MLH1* (HENDRIKS et al. 2006a).

Esse mecanismo epigenético ocorre em cerca de 10% dos pacientes com CCR e por sua vez, pode causar diminuição da especificidade da IHQ ou MSI em tumores de pacientes com alteração no gene *MLH1* (MECKLIN 2008). Esse fenômeno tem sido associado a mutações específicas no gene *BRAF* no tecido tumoral. A análise de *BRAF* no tumor é uma estratégia de baixo custo e efetiva para distinguir um evento somático/hipermetilação de uma possível mutação germinativa no gene *MLH1*. Se a mutação específica V600E no gene *BRAF* for encontrada no DNA tumoral, não está indicada a análise de mutação para *MLH1* (HENDRIKS et al. 2006a). Adicionalmente, um polimorfismo germinativo no promotor do gene *MLH1* tem sido reportado por estar associado com o risco de CCR e uma alta MSI. Essas variantes,

particularmente as homozigotas, poderiam também oferecer uma explicação para essa situação (POYNTER et al. 2008).

Outra explicação seria a presença de rearranjos genômicos de exons inteiros no gene *MLH1* não detectados pelo sequenciamento automático. Um estudo realizado por HENDRIKS et al. (2006a) identificou quatro rearranjos genômicos em um grupo de 112 pacientes com suspeita de SL que foram negativos para análise de mutação em *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*.

Os pacientes SL-15D e SL-19D apresentaram MSS e expressão positiva para os dímeros MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6. No entanto, a análise de sequenciamento revelou uma mutação do tipo *missense* patogênica no gene *MLH1* do paciente SL-15D, e uma *nonsense* no gene *MSH2* do paciente SL-19D. A presença de mutações nos casos de MSS negativo pode sugerir possíveis mecanismos de tumorigênese em pessoas com mutação em outros genes ainda não identificados.

Similarmente ao nosso resultado, um estudo detectou mutações germinativas em 16 de 22 famílias com suspeita de SL com MSI quando comparado com 37 mutações detectadas em pacientes negativos para MSI (MITCHELL et al. 2002).

KOURAKLIS e MISIAKIS (2003) sugerem que nenhum dos três métodos (sequenciamento/IHQ/MSI) deve ser utilizado de maneira independente para o diagnóstico genético de pacientes com suspeita de SL. A combinação destes métodos com a história familiar também deve ser sempre considerada (LYNCH et al. 2007b).

Nossos resultados apresentaram uma correlação de 79% entre os três testes, sugerindo que a combinação destas metodologias nos pacientes com suspeita de SL, pode auxiliar o diagnóstico e apropriado aconselhamento genético.

6 CONCLUSÕES

- ✓ 32 (30%) mutações patogênicas em 30 pacientes estudados apresentaram nos genes *MLH1* ou *MSH2*.
- ✓ 21/41 (51,2%) pacientes que preencheram os critérios de Amsterdam e 9/58 (15,5%) que preencheram os critérios de Bethesda apresentaram mutações patogênicas nos genes *MLH1* ou *MSH2*.
- ✓ A metodologia de sequenciamento automático mostrou-se eficaz na detecção de alterações pontuais e de pequenas deleções, inserções ou duplicações nos genes *MLH1* e *MSH2*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnio M, Mecklin J, Aaltonen L, Nyström-Lahti M, Järvinen H. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. **Int J Cancer** 1995; 6:430-3.

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

Aissi-Ben Moussa S, Moussa A, Lovecchio T, et al. Identification and characterization of a novel MLH1 genomic rearrangement as the cause of HNPCC in a Tunisian family: evidence for a homologous Alu-mediated recombination. **Fam Cancer** 2009; 8:119-26.

Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Roberts K, Walter P. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed; 1999. Replicação do DNA, reparo e recombinação: os elementos genéticos móveis podem mover-se por meio de mecanismos transposicionais ou conservativos; p.286-9.

Apeessos A, Mihalatos M, Danielidis I, et al. hMSH2 is the most commonly mutated MMR gene in a cohort of Greek HNPCC patients. **Br J Cancer** 2005; 92:396-404.

Arnold S, Buchanan DD, Barker M, et al. Classifying MLH1 and MSH2 variants using bioinformatic prediction, Splicing assays, segregation, and tumor characteristics. **Hum Mutat** 2009; 30:757-70.

Backes FJ, Hampel H, Backes KA, et al. Are prediction models for Lynch syndrome valid for probands with endometrial cancer? **Fam Cancer** 2009; 8:483-7.

Bai YQ, Akiyama Y, Nagasaki H, et al. Predominant germ-line mutation of the hMSH2 gene in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. **Int J Cancer** 1999; 82:512-5.

Balmaña J, Balaguer F, Castellví-Bel, et al. Comparison of predictive models, clinical criteria and molecular tumor screening for the identification of patients with Lynch syndrome in a population-based cohort of colorectal cancer patients. **J Med Genet** 2008; 45:557-63.

Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, et al. Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. **JAMA** 2006; 296:1469-78.

Baudhuin L, Burgart L, Leontovich O, Thibodeau S. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:255-65.

Baudi F, Fersini G, Lavecchia A, et al. A novel missense germline mutation in exon 2 of the hMSH2 gene in a HNPCC family from Southern Italy. **Cancer Lett** 2005; 223:285-91.

Benatti P, Sassatelli R, Roncucci L, et al. Tumour spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and in families with "suspected HNPCC". A population-based study in northern Italy. Colorectal Cancer Study Group. **Int J Cancer** 1993; 54:371-7.

Berginc G, Bračko M, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Screening for germline mutations of MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 genes in Slovenian colorectal cancer patients: implications for a population specific detection strategy of Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2009; 421-9.

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

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

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

Byfield SAD, Syngal S. Clinical guidelines versus universal molecular testing: Are we ready choose an optimal strategy for Lynch syndrome identification? **Am J Gastroenterol** 2008; 103:2837-40.

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

Charbonier F, Olschwang S, Wang Q, et al. MSH2 in contrast to MLH1 and MSH6 is frequently inactivated by exonic and promoter rearrangements in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Res** 2002; 62:848-53.

Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K, Lee J, Watson P, et al. Prediction of Germiline Mutations and Cancer Risk in the Lynch Syndrome. **JAMA** 2006; 296:1479-87.

Chialina SG, Fornes C, Landi C, et al. Microsatellite instability analysis in hereditary non-polyposis colon cancer using the Bethesda consensus panel of microsatellite markers in the absence of proband normal tissue. **BMC Medical Genetics** 2006; 7:1-5.

Couch FJ, Rasmussen LJ, Hofstra R, et al. Assessment of functional effects of unclassified genetic variants. **Hum Mutat** 2008; 29:1314-26.

Cristofaro G, Lynch H, Caruso M, et al. New phenotypic aspects in a family with Lynch syndrome II. **Cancer** 1987; 60:51-8.

Cutait R, Cottig G, Silva RV, et al. Diagnóstico clínico de HNPCC: Caracterização de famílias “Amsterdam” positivas. **Rev Bras Coloproctol** 2005; 25:6-11.

Da Silva FCC, Dominguez MV, Ferreira FO, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **São Paulo Med J** 2009; 127:46-51.

de Jong A, van Puijenbroek M, Hendriks Y, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Cancer Res** 2004; 10:972-80.

de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:769-80.

de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:233-7.

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

Desai DC, Lockman JC, Chadwick RB, et al. Recurrent germline mutation in MSH2 arises frequently de novo. **J Med Genet** 2000; 37:646-52.

Dominguez MV, Bastos EP, Santos EMM, et al. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian Lynch syndrome families. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:1263-4.

Doss GP, Sethumadhavan R. Investigation on the role of nsSNPs in HNPCC genes- a bioinformatics approach. **J Biomed Science** 2009; 16:42.

Dovrat S, Figer A, Fidder H, et al. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. **Fam Cancer** 2005; 4:291-4.

Drummond J, Li G, Longley M, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. **Science** 1995; 268:1909-12.

Duarte-Franco E, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. 1 ed. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2004. p.3-22.

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

Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. **Cancer Res** 2001; 61:7369-74.

Fitzgibbons RJ, Lynch H, Stanislav G, et al. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). **Ann Surg** 1987; 206:289-95.

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

Gomez LC, Marzese DM, Adi J, et al. LPA mutation detection in Argentine HNPCC and FAP families. **Fam Cancer** 2009; 8:67-73.

Greenblatt MS, Brody LC, Foulkes W, et al. Locus-specific database and recommendations to strengthen their contribution to the classification of variants in cancer susceptibility genes. **Hum Mutat** 2008; 29: 1273-81.

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

Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. The added value of PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Fam Cancer** 2006; 5:353-8.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma): A guide for clinicians. **Ca Cancer J Clin** 2006a; 56:213-25.

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

Hutter P, Couturier A, Membrez V, et al. Excess of hMLH1 germline mutations in Swiss families with hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Int J Cancer** 1998; 78: 80-4.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. **Carcinogenesis** 2008; 29:673-80.

[INSIGHT] International Society of Hereditary Gastrointestinal Cancer. **Data base**. Available from: <URL:<http://www.insight-group.org/>> [2009 jul 12]

Järvinen H, Mecklin J, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology** 1995; 108:1405-11.

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

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

Jass J. Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: the rise and fall of a confusing term. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4943-50.

Jin HY, Liu X, Li VK, et al. Detection of mismatch repair gene germline mutation carrier among Chinese population with colorectal cancer. **BMC Cancer** 2008; 8:44.

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

Kámory E, Tanyi M, Kolacsek O, et al. Two germline alterations in mismatch repair genes found in a HNPCC patient with poor family history. **Pathol Oncol Res** 2006; 12:228-33.

Kirk JA. How can we best detect hereditary non-polyposis colorectal cancer? **Med J Austr** 2006; 184:206-7.

Kouraklis G, Misiakis EP. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): Criteria for identification and management. **Dig Dis Sci** 2003; 48:1745-50.

Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, et al. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. **Hum Mutat** 2009; 30:197-203.

Kowalski LD, Mutch DG, Herzog TJ, Rader JS, Goodfellow PJ. Mutational analysis of MLH1 and MSH2 in 25 prospectively-acquired RER+ endometrial cancers. **Genes Chromosomes Cancer** 1997; 18:219-27.

Krüger S, Bier A, Plaschke J, et al. Ten novel MSH2 and MLH1 germline mutations in families with HNPCC. **Hum Mutat** 2004; 24:351-2.

Kurnat-Thoma EL. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome): Molecular pathogenesis and clinical approaches to diagnosis and management for Nurses. **Biol Res Nurs** 2008; 9:185-99.

Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, et al. Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. **J Biochem Biophys Methods** 2002; 51:89-100.

Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, et al. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:291-9.

Lindblom A, Tannergard P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. **Nat Genet** 1993; 5:279-82.

Liu SR, Zhao B, Wang ZJ, Wan YL, Huang YT. Clinical features and mismatch repair gene mutation screening in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol** 2004; 10:2647-51.

Love R. Small bowel cancers, B-cell lymphatic leukemia, and six primary cancers with metastases and prolonged survival in the cancer family syndrome of Lynch. **Cancer** 1985; 55:499-502.

Lu H, Broaddus R. Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC. **Fam Cancer** 2005; 4:249-54.

Lützen A, de Wind N, Georgijevic D, Nielsen FC, Rasmussen LJ. Functional analysis of HNPCC-related missense mutations in MSH2. **Mutat Res** 2008; 645:44-55.

Lynch HT, Voorhees G, Lanspa S, McGreevy P, Lynch J. Pancreatic carcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a family study. **Br J Cancer** 1985; 52:271-3.

Lynch HT, Ens J, Lynch J, Watson P. Tumor variation in three extended Lynch syndrome II kindreds. **Am J Gastroenterol** 1988a; 83:741-7.

Lynch HT, Lanspa SJ, Boman BM, Smyrk T, Watson P, Lynch JF. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer-Lynch syndromes I and II. **Gastroenterol Clin North Am** 1988b; 17:679-712.

Lynch HT, Ens J, Lynch J. The Lynch syndrome II and urological malignancies. **J Urol** 1990; 143:24-8.

Lynch HT, Shaw T, Lynch J, Grady W. Histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose: Síndrome de Lynch. In: Rossi B, Nakagawa W, Ferreira F, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.575-93.

Lynch HT, Lynch J, Lynch P. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). **J Natl Cancer Inst** 2007a; 99:261-3.

Lynch HT, Fussaro R, Lynch JF. Hereditary cancer syndrome diagnosis: molecular genetic clues and cancer control. **Future Oncol** 2007b; 3:169-81.

Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. **CMAJ** 2009a 18:273-80.

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

Martínez-Bouzas C, Ojembarrena E, Beristain E, Errasti J, Viguera N, Tejada-Minguéz MI. High proportion of large genomic rearrangements in hMSH2 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families of the Basque Country. **Cancer Lett** 2007; 255:295-9.

Mecklin J, Järvinen H, Peltokallio P. Cancer family syndrome. Genetic analysis of 22 Finnish kindreds. **Gastroenterology** 1986; 90:328-33.

Mecklin JP. The implications of genetics in colorectal cancer. **Ann Oncol** 2008; 19:87-90.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2007.

[MMR] Mismatch Repair Genes Variant Database. **Data base**. Available from: <URL:<http://www.med.mun.ca/mmrvariants>> [2009 jul 12]

Mitchell RJ, Farrington SM, Dunlop MG, Campbell H. Mismatch repair genes MLH1 and MSH2 and colorectal cancer: a huge review. **Am J Epidemiol** 2002; 156:885-902.

Ng PC, Henikoff S. Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res** 2001; 47:370-8.

Niessen RC, Berends MJ, Wu Y, et al. Identification of mismatch repair gene mutations in young patients with colorectal cancer and in patients with multiple tumours associated with hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 2006; 55:1781-8.

Nyström-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Hum Mol Genet** 1996; 5: 763-9.

Olilla S, Bebek DD, Jiricny J, Nyström M. Mechanisms of pathogenicity in Human MSH2 missense mutants. **Hum Mutat** 2008; 29:1355-63.

Olilla S, Sarantaus L, Kariola R et al. Pathogenicity of MSH2 missense mutations is typically associated with impaired repair capability of the mutated protein. **Gastroenterology** 2006; 131:1408-17.

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

Ou J, Niessen RC, Lützen A, et al. Functional analysis helps to clarify the clinical importance of unclassified variants in DNA mismatch repair genes. **Hum Mutat** 2007; 28:1047-54.

Ou J, Niessen RC, Vonk J, et al. A Database to support the interpretation of human mismatch repair gene variants. **Hum Mutat** 2008; 29:1337-41.

Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. **Science** 1995; 268:1912-4.

Park SJ, Lee KA, Park TS, et al. A novel missense MSH2 gene mutation in a patient of a Korean family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cancer Genet Cytogenet** 2008; 182:136-9.

Peltomäki P, Aaltonen L, Sistonen P, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. **Science** 1993; 260:810-2.

Peltomäki P, Vasen HFA. The international collaborative group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Database and results of a collaborative study. **Gastroenterology** 1997; 113:1146-58.

Peltomäki P. Lynch syndrome genes. **Fam Cancer** 2005; 4:227-32.

Pensotti V, Radice P, Presciuttini S, et al. Mean age of tumor onset in hereditary Non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families correlates with the presence of mutations in DNA mismatch repair genes. **Genes Chrom Cancer** 1997; 19:135-42.

Pinol V, Castells A, Andreu M, et al. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **JAMA** 2005; 293:1986-94.

Pistorius S, Görgens H, Plaschke J, et al. Genomic rearrangements in MSH2, MLH1 or MSH6 are rare in HNPCC patients carrying point mutations. **Cancer Lett** 2007; 248:89-95.

Pouchet CJ, Wong N, Chong G, et al. A comparison of models used to predict MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers. **Ann Oncol** 2009; 20:681-8.

Poynter JN, Siegmund KD, Weisenberger DJ, et al. Molecular characterization of MSI-H colorectal cancer by MLH1 promoter methylation, immunohistochemistry, and mismatch repair germline mutation screening. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2008; 17:3208-15.

Rangel MC, da Silva SD, Pereira NC, Dominguez MV. Essentials of molecular biology in cancer research. **Appl Cancer Res** 2008; 28:2-10.

Renkonen E, Lohi H, Järvinen HJ, et al. Novel splicing associations of hereditary colon cancer related DNA mismatch repair gene mutations. **J Med Genet** 2004; 41:1-6.

Robinson KL, Liu T, Vandrovcova J, et al. Lynch syndrome (Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer) Diagnostics. **J Natl Cancer Inst** 2007; 99:291-9.

Rocha JCC. Agregação familiar de câncer colorretal. In: Rossi B, Nakagawa W, Ferreira F, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de Cólon, Reto e Anus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.601-7.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, 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.

Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, et al. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. **South Am J Cancer** 1997; 1:191-7.

Rossi BM, Lopes A, Oliveira FF. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 9:551-61.

Rouleau E, Lefol C, Bourdon V, et al. Quantitative PCR high-resolution melting (qPCR-HRM) curve analysis, a new approach to simultaneously screen point mutations and large rearrangements: application to MLH1 germline mutations in Lynch syndrome. **Hum Mutat** 2009; 30:867-75.

Sakurai M, Zhao Y, Oki E, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y. High-resolution fluorescent analysis of microsatellite instability in gastric cancer. **Eur J Gastroenterol Hepatol** 2007; 19:701-9.

Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science** 1981; 214:1205-210.

Shendure J, Ji H. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol** 2008; 26:1135-45.

Shin YK, Heo SC, Shin JH, et al. Germline mutations in MLH1, MSH2 and MSH6 in Korean hereditary non-polyposis colorectal cancer families. **Hum Mutat** 2004; 24:351, Erratum in: **Hum Mutat** 2005; 25:224.

Sjöblom T, Jones S, Wood LD, et al. The consensus coding sequences of human breast and colorectal cancers. **Science** 2007; 315:762-4.

Tang R, Hsiung C, Wang J-Y et al. Germ line MLH1 and MSH2 mutations in Taiwanese Lynch syndrome families: characterization of a founder genomic mutation in the MLH1 gene. **Clin Genet** 2009; 75:334-45.

Truninger K, Menigatti M, Luz J, et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. **Gastroenterology** 2005; 128:1160-71.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **J Natl Cancer Inst** 2004a; 96:261-8.

Umar A, Risinger J, Hawk E, Barrett J. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2004b; 4:153-8.

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

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. **Gastroenterology** 1999; 116:1453-6.

Vasen H, Boland C. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. **JAMA** 2005; 293:2028-30.

Wang J, Luo M, Zhang Z, et al. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. **World J Gastroenterol** 2007; 13:1612-7.

Wei SC, Yu CY, Tsai-Wu JJ, et al. Low mutation rate of hMSH2 and hMLH1 in Taiwanese hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Clin Genet** 2003; 64:243-51.

Yan H, Jin H, Xue G, et al. Germline hMSH2 promoter mutation in a chinese HNPCC kindred: evidence for dual role of LOH. **Clin Genet** 2007; 72:556-61.

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

Yearsley M, Hampel H, Lehman A, Nakagawa H, de la Chapelle A, Frankel WL. Histologic features distinguish microsatellite-high from microsatellite-low and microsatellite-stable colorectal carcinomas, but do not differentiate germline mutations from methylation of the MLH1 promoter. **Hum Pathol** 2006; 37:831-8.

Yu VP, Novelli M, Payne SJ, et al. Unusual presentation in Lynch syndrome. **Hered Cancer Clin Pract** 2009; 7:12.

Yuan Z, Legendre B Jr, Sreeramoju P, et al. A novel mutation detection approach of hMLH1 and hMSH2 genes for screening of colorectal cancer. **Cancer Detect Prev** 2006; 30:333-40.

Zavodna K, Bujalkova M, Krivulcik T, et al. Novel and recurrent germline alterations in the MLH1 and MSH2 genes identified in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients in Slovakia. **Neoplasma** 2006; 53:269-76.

Zhang J, Lindroos A, Olilla S, et al. Gene conversion is a frequent mechanism of inactivation of the wild-type allele in cancers from MLH1/MSH2 deletion carriers. **Cancer Res** 2006; 66:659-64.

Anexo 1 - Método para precipitação da reação de sequenciamento por Etanol/EDTA

1. Adicionar 1,0 μ l de 125mM EDTA (pH 8.0) a cada amostra;
2. Adicionar 0, 1 μ l de Acetato de sódio 3M (pH 5.2) a cada amostra;
3. Adicionar 25 μ l de etanol 100% a cada amostra;
4. Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos no escuro;
5. Centrifugar a 4°C a 3800 rpm por 45 minutos;
6. Lavar com 35 μ l de etanol 70% a cada amostra;
7. Centrifugar a 4°C a 3800 rpm por 45 minutos;
8. Secar a 95°C por 2 minutos.

Anexo 2 - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

**HOSPITAL
DO CÂNCER**

Comitê de Ética em Pesquisa
CEP

São Paulo, 08 de novembro de 2006.

Ao
Dr. Benedito Mauro Rossi

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 831/06
"Seqüenciamento dos genes hMLH1 e hMSH2 em famílias com câncer colorretal hereditário sem polipose".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo, em sua última reunião de 31/10/2006, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 26/09/2006, aprovaram a realização do projeto em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- ✓ Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos;
- ✓ Justificativa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;
- ✓ Orçamento detalhado do projeto.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 3 - Quantificação e Qualidade dos DNAs estudados.

CÓDIGO DE LABORATÓRIO	QUANTIDADE DNA (µg)	QUALIDADE DNA
SL-1	17,14	Excelente
SL-3	57,99	Excelente
SL-4	35,40	Excelente
SL-5	16,44	Excelente
SL-6	10,10	Excelente
SL-8	31,56	Excelente
SL-11	70,92	Excelente
SL-12	95,80	Excelente
SL-13	98,55	Excelente
SL-14	91,90	Excelente
SL-15	8,16	Excelente
SL-16	29,1	Excelente
SL-17	39,51	Excelente
SL-18	79,95	Excelente
SL-19	24,31	Excelente
SL-20	14,56	Excelente
SL-21	34,75	Excelente
SL-22	103,67	Excelente
SL-23	82,80	Excelente
SL-24	101,58	Excelente
SL-25	52,42	Excelente
SL-26	70,90	Excelente
SL-27	30,30	Excelente
SL-28	45,93	Excelente
SL-29	58,86	Excelente
SL-30	94,34	Excelente
SL-31	78,94	Excelente
SL-32	116,58	Excelente
SL-33	80,77	Excelente
SL-34	109,99	Excelente
SL-35	93,78	Excelente
SL-36	16,63	Excelente
SL-37	29,2	Excelente
SL-38	97,82	Excelente
SL-39	27,16	Excelente
SL-40	47,39	Excelente
SL-41	79,47	Excelente
SL-42	27,59	Excelente
SL-43	88,37	Excelente
SL-44	91,66	Excelente
SL-45	27,49	Excelente
SL-46	96,68	Excelente
SL-47	131,69	Excelente
SL-49	30,74	Excelente
SL-50	36,39	Excelente
SL-51	149,92	Excelente
SL-52	34,19	Excelente
SL-53	27,08	Excelente
SL-54	51,93	Excelente
SL-56	37,92	Excelente

SL-58	42,23	Excelente
SL-59	46,95	Excelente
SL-60	41,95	Excelente
SL-61	21,61	Excelente
SL-62	65,34	Excelente
SL-63	50,85	Excelente
SL-64	29,22	Excelente
SL-65	33,50	Excelente
SL-66	47,53	Excelente
SL-67	32,90	Excelente
SL-68	25,30	Excelente
SL-69	26,39	Excelente
SL-70	60,91	Excelente
SL-71	31,95	Excelente
SL-72	45,95	Excelente
SL-73	31,80	Excelente
SL-74	69,49	Excelente
SL-75	42,18	Excelente
SL-76	57,68	Excelente
SL-77	110,14	Excelente
SL-78	14,19	Excelente
SL-79	78,08	Excelente
SL-80	52,97	Excelente
SL-81	114,57	Excelente
SL-82	103,13	Excelente
SL-83	30,93	Excelente
SL-84	153,44	Excelente
SL-85	274,86	Excelente
SL-86	94,35	Excelente
SL-87	41,21	Excelente
SL-88	77,85	Excelente
SL-89	99,06	Excelente
SL-90	64,32	Excelente
SL-91	49,31	Excelente
SL-92	320,25	Excelente
SL-93	415,51	Excelente
SL-94	55,15	Excelente
SL-95	35,45	Excelente
SL-96	60,83	Excelente
SL-97	32,15	Excelente
SL-2-1	23,60	Excelente
SL-2-2	12,97	Excelente
SL-2-3	14,26	Excelente
SL-2-5	96,54	Excelente
SL-2-6	80,67	Excelente
SL-2-7	95,5	Excelente
SL-2-8	116,60	Excelente
SL-2-9	93,1	Excelente

Two new *MLH1* germline mutations in Brazilian lynch syndrome families

M. V. Dominguez · E. P. Bastos · E. M. M. Santos ·
L. P. Oliveira · F. O. Ferreira · D. M. Carraro ·
B. M. Rossi

Accepted: 4 June 2008 / Published online: 2 July 2008
© Springer-Verlag 2008

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem worldwide, with a current annual incidence approaching 950,000 cases. Around 3–5% of all CRC cases are recognized as hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), or Lynch Syndrome (LS), which is an inherited syndrome predisposing to the early development of cancers of colon, rectum, endometrium, ovary, small bowel, stomach, and urinary tract, with an estimated penetrance of 80%. The clinical diagnosis is made by characteristic family history.

This autosomal dominantly inherited disorder is caused by germline mutations in genes coding proteins responsible for the repair of DNA replication errors, which are referred to as DNA mismatch repair (MMR) genes. At present, seven MMR genes are known (*MLH1*, *MSH2*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* and *PMS2*); however, the influence of a specific mutation on the pathogenesis of the disease shows great diversity.

According to InSIGHT (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors) database, approximately 50% and 40% of the HNPCC-causing mutations are found in the *MLH1* (MIM#120436) and *MSH2* (MIM#120435) genes, respectively. In total, 259 different pathogenic mutations have been identified in *MLH1*, along with 45 polymorphisms. The *MLH1* gene is a component of the mismatch repair pathway and is located at chromosome

3p21–23, and it has been shown to form heterodimer with *MLH3*, *PMS2* or *PMS1*. The *MLH1* protein has no known enzymatic activity and probably acts as a “molecular matchmaker” in that it recruits other DNA repair proteins to the mismatch repair complex.

In this study, our goal was to perform the genetic analysis of 20 patients who had been selected by Amsterdam and Bethesda Criteria, and to identify the novel genetic alterations in the *MLH1* gene.

Samples and DNA extraction. Blood sample was collected from one adult healthy control who did not present mutation in *MLH1* gene, and it was used as a reference for denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) experiment. We analyzed DNA from 20 samples from 15 families who met the stringent Amsterdam criteria, and five fulfilling the Bethesda criteria obtained at the Department of Pelvic Surgery of the Hospital A.C. Camargo after an informed consent. DNA was directly extracted from 3 ml of whole blood using Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems, USA) according to manufacturer’s instructions.

PCR conditions. Primers were designed to amplify all exons and splice sites of *MLH1* and *MSH2* genes (GenBank accession number NM.000249 and NM.000251, respectively). Primers used in this study were divided in two fragments for exons upper of 250 bases in order to obtain the best performance in DHPLC analysis.

DHPLC. DNAs amplified as described above were submitted to a denaturing step by heating at 95°C for 5 min followed by a gradual re-annealing to enhance heteroduplex formation. Fifteen microliters of each re-annealed polymerase chain reaction (PCR) product was applied to an automated DHPLC apparatus equipped with DNASep column (wave-nucleic acid fragment analysis system-Transgenomic, Omaha, NE, USA).

M. V. Dominguez · E. P. Bastos · D. M. Carraro
Laboratory of Genomic and Molecular Biology,
Treatment and Investigation Center, Hospital A.C. Camargo,
São Paulo, Brazil

M. V. Dominguez · E. M. M. Santos · L. P. Oliveira ·
F. O. Ferreira · B. M. Rossi (✉)
Department of Pelvic Surgery, Hospital A.C. Camargo,
Rua Professor Antonio Prudente,
211-01509-900 São Paulo, Brazil
e-mail: bmrossi@hcancer.org.br

DNA sequencing. PCR products showing altered DHPLC profile were purified with the GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, SP, Brazil) and sequenced in both directions. Sequencing reactions were separated on ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SP, Brazil).

Among the 20 probands from 20 Brazilian HNPCC kindreds, 460 PCR products of 14 exons of *MLH1* and nine exons for *MSH2* were screened by DHPLC. These exons included in this study are frequently most affected in HNPCC kindreds. Two PCR products found with variation elution peaks by DHPLC were identified to have mutations. One was in intronic region at exon 15 of *MLH1* at nt. 1707 A→G in SL-1D proband. The SL-1D proband was a 44-year-old woman from a family that fulfilled the Amsterdam Criteria. She had a right colon cancer (T2N0M0) diagnosed in 2003, and she was submitted to a partial colectomy and to adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and folinic acid for 12 months in another institution. In 2005, she was diagnosed with gastric cancer, submitted to a partial gastrectomy and liver metastasis resection (T2N0M1). She had a low-grade adenoma resected in 2008. In this kindred, each PCR product from altered DHPLC profile for *MLH1* and *MSH2* genes was tested by direct DNA sequencing. The transversion was found in intron 15 at nt. 1707 A→G of *MLH1* gene.

The other mutation was found in SL-6D proband by DHPLC and confirmed by sequencing analysis, a single substitution at nt. 1632 G→A of intron 13 of *MLH1* was found. The SL-6D proband was a 47-year-old man and his family who fulfilled the Amsterdam Criteria. Screening colonoscopy showed two colon adenocarcinomas. In 2005, he was submitted to a proctocolectomy with J pouch and temporary ileostomy. The pathological examination showed three tumors: one in the cecum, another in the right colon, and a third one in the left colon. All tumors were well-differentiated adenocarcinoma with mucinous component, without lymph node involvement. In 2007, a 2-cm low-grade adenoma was diagnosed, located at 0.5 cm from the anal sphincter. He is in follow-up without evidence of disease.

Colorectal cancer is one of the most common cancers, and its clinical selection criteria for LS were first established in Amsterdam in 1991 by the International Collaborative Group on HNPCC, and modified in 1999. Identification of germline mutations of either *MLH1* or *MSH2* could be possible in 50–70% of families meeting the Amsterdam criteria for LS. Families not complying with these criteria show a much lower frequency of the MMR gene mutation identification. Thus, *MLH1* and *MSH2* gene testing is most often used in early diagnosis of at-risk family members with HNPCC. To identify a population-specific panel of mutations, it is crucial to describe them in all ethnic groups. 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 Portuguese, Italian and Japanese migration, as well as from Africa, and native Brazilian Indians, which is similar to that observed in Colombia, but in contrast to LS families from Uruguay. Rossi et al [1] reported for the first time seven novel mutations in *MLH1* and *MSH2* in 25 unrelated LS Brazilian families.

In this study, two novel nonsense mutations were found among 20 Brazilian HNPCC kindreds. The mutations found were compared to mutations already described in the database of the International Collaborative Group on HNPCC (<http://www.insight-group.org>) and Human Gene Mutation Database (HGMD). To our knowledge, these two intronic mutations bordering exons 13 and 15 of *MLH1* represent novel alterations that, to date, have not been observed in other HNPCC kindreds. These mutations were not predicted to result in severely truncated protein products with impaired capacity in MMR.

References

1. Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ (2002) hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 9(6):555–561, July