

**CORRELAÇÃO CLÍNICO-MOLECULAR EM
PACIENTES PORTADORES DE CÂNCER
PERTENCENTES A FAMÍLIAS COM SUSPEITA
DE SÍNDROME DE LYNCH**

WILSON TOSHIHIKO NAKAGAWA

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Benedito Mauro Rossi

**Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto
Soares**

São Paulo

2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Nakagawa, Wilson Toshihiko

**Correlação clínico-molecular em pacientes portadores de câncer
pertencentes a famílias com suspeita de Síndrome de Lynch /**

Wilson Toshihiko Nakagawa - São Paulo, 2010.

130p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Benedito Mauro Rossi

Descritores: 1. SÍNDROME DE LYNCH. 2. NEOPLASIAS
COLORRETAIS HEREDITÁRIAS SEM POLIPOSE. 3. CÂNCER. 4.
NEOPLASIAS. 5. IMUNOISTOQUÍMICA.

DEDICATÓRIA

À Jury e ao Vitor e Vinícius
Por serem a razão de tudo

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos a

Ademar Lopes

Alexsander Kuroiwa Bressan

Ana Kuninari

Benedito Mauro Rossi

Dirce Carraro

Erica Maria Monteiro

Fabio de Oliveira Ferreira

Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva

Fernando Augusto Soares

Gustavo Guimarães

Hide Contesini

Ligia Petrolini de Oliviera

Mev Dominguez Valentin

Samuel Aguiar Junior

Suely Francisco

Pelos motivos que vocês e eu conhecemos.

RESUMO

Nakagawa WT. **Correlação clínico-molecular em pacientes portadores de câncer pertencente a famílias com suspeita de Síndrome de Lynch.** São Paulo; 2010. [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Introdução - A Síndrome de Lynch é uma doença hereditária que predispõe aos tumores colorretais, entre outros tumores, em idade precoce, com padrão de herança autossômica dominante, representando a principal causa de hereditária de câncer intestinal. Os genes de reparo defeituosos são responsáveis pela síndrome e podem ser identificados através dos testes de seqüenciamento dos genes. Os genes *MLH1* e *MSH2* são responsáveis por mais de 85% das mutações germinativas encontradas nestas famílias. O restante são causadas por outros genes de menor incidência, *MSH6* e *PMS2*. A correlação clínico-molecular foi avaliada mais extensivamente em populações norte-americanas, com poucos estudos com a população brasileira. **Objetivos** - Este estudo tem como objetivo avaliar a correlação clínico-molecular de dados referentes aos pacientes com suspeita de SL, assim como de dados de membros da família com câncer relacionados à síndrome. **Materiais e métodos** – foram estudados 43 pacientes probandos e os familiares selecionados a partir de casuística do Hospital A.C. Camargo que preenchiam os critérios clínicos para SL, Amsterdam I ou II e também pacientes com critérios de Bethesda que apresentassem mutação em qualquer dos genes de reparo. Todos os pacientes foram submetidos a pesquisa de mutações, por seqüenciamento direto, nos genes *MLH1* e *MSH2* e nos casos inconclusivos foram avaliados também para os genes *MSH6* e *PMS2*. As variáveis clínicas, anatomopatológicas e dados familiares foram correlacionados com as informações obtidas dos estudos moleculares. Para a averiguação de associações entre variáveis foi realizada análise univariada, através do teste qui-quadrado ou exato de Fisher, e a sobrevida dos pacientes probandos através do método de Kaplan-Meier. **Resultados** -

A frequência de identificação de mutação patogênica nos genes de reparo foi de 60,2%, em 26 probandos. A maioria das mutações ocorreram em genes *MSH2* e *MLH1* com 11 em cada gene. Mutação em *PMS2* e *MSH6* foi encontrado em 2 indivíduos cada. Correlacionado os fatores clínicos com o achado de mutação os fatores estatisticamente significante foram: tumor de cólon de localização proximal, relação de número de indivíduos com câncer na família com número total de indivíduos na família, alteração de imunistoquímica em proteínas de reparo e alteração específica de *PMS2*. Apresentaram relação inversa com achado de mutação a presença de tumores de SNC nas famílias. A correlação específica com mutação em gene *MSH2* mostrou correlação com infiltrado linfocitário em CCR do probando e a presença de adenomas na família, além de ausência de expressão de proteína *MSH2* e *MSH6* nos tumores do probando e relação negativa com ausência de proteína *PMS2* e presença de tumor de mama na família. A correlação realizada com mutação em gene *MLH1* observou se relação com CCR de localização proximal, idade < 50 anos em familiar com CCR, densidade de tumor na família e ausência de expressão de proteína *PMS2* no tumor. Apresentou relação negativa com a expressão das proteínas *MSH2* e *MLH1*. **Conclusão:** Foram identificados variáveis clínicas que diferenciam as famílias com mutação (Síndrome de Lynch) das que não apresentam a mutação (Síndrome X). Identificou-se diferenças clínicas em relação a mutação nos genes *MLH1* e *MSH2* podendo indicar uma correlação genótipo-fenótipo na SL em famílias brasileiras.

SUMMARY

Nakagawa WT. **[Clinical-molecular correlation in patients with cancer related to a Lynch Syndrome suspected families]**. São Paulo; 2010 [Tese de Doutorado-Fundação Antonio Prudente]

Introduction: Lynch Syndrome (LS) is an inherited disease with high-risk for colorectal cancer (CRC), as well as other tumors, onset in an early age, in an autosomal dominant pattern and represent the most common hereditary cause of CRC. The mismatch repairs (MMR) genes deficiency are responsible for the syndrome, and the genes sequencing tests can identify it. The *MSH2* and *MLH1* genes are responsible for more than 85% of known germline mutations in these families. Other low incidence genes, *MSH6* and *PMS2*, cause the rest of disease. The clinical-molecular correlation has been studied more extensively in North America and Europe populations, and there is only a few series including Brazilian population. **Objectives:** The aim of this study is making a clinic-molecular correlation of LS suspect patients and their families' data and the results of genes mutations analyses. **Material and methods:** 43 fulfilled Amsterdam I or II criteria patients and Bethesda criteria with MMR genes mutation patients were selected for the study. All the patients were submitted to MMR genes mutations analysis by direct sequencing in *MLH1* and *MSH2* genes. When it was lack of mutation in that genes it was tested for *MSH6* and *PMS2*. Clinical, pathological and families variables were correlated with genes mutations or not in a univariate analysis, using chi-square test or Fisher exact Test, and the proband survival was analyzed with Kaplan-Meier method. **Results:** A pathogenic MMR genes mutations identification frequency was 60,5%, in 26 proband patients. The majority of mutations were found in *MSH2* and *MLH1* genes, eleven mutations in each gene. *PMS2* and *MSH6* were found in 2 probando each. A correlation of clinic a mutation finds we detect statistically significant difference in: proximal location of CRC, tumor density in a family (number of

kindred with cancer in a family and total number of family members) immunohistochemistry of MMR proteins alterations in PMS2. There were inverse relations with central nervous system tumors in a family. A specific *MSH2* gene mutation was studied in a correlation and we find lymphocyte infiltrating in the proband CRC, adenomatous polyps in the family, and negative expression of MSH2 and MSH6 proteins in the proband tumor. We find a negative relation with lack of PMS2 protein and presence of breast cancer in the family. Mutations in *MLH1* genes were correlated with proximal location of colon cancer, early age under 50 years old in family CRC, density of tumor in family and negative expression of the PMS2 protein in the tumor. We find a negative correlation with expression of MSH2 and MSH6 proteins.

Conclusion: we identify differences in the HNPCC families with and without MMR genes mutation. We find some clinical differences between *MSH2* and *MLH1* genes mutations, showing the correlation of genotype-phenotype in Brazilian LS.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Classificação das famílias incluídas no estudos conforme os critérios clínicos de Amsterdam e os de Bethesda somente com confirmação molecular de diagnóstico de SL por achado de mutação em genes de reparo.....	38
Figura 2	Distribuição de acordo com a faixa etária do primeiro CCR diagnosticado no probando.....	55
Figura 3	Gráfico mostrando a distribuição dos CCR de acordo com o número de CCR, se sincrônico, metacrônico, único ou sem tumor de cólon ou reto no probando.....	56
Figura 4	Sobrevida atuarial livre de doença dos pacientes probandos tratados de CCR	57
Figura 5	Frequência de tumores extracolônicos, relacionado com a SL, encontrados nos probandos.....	59
Figura 6	Todos os tumores extracolônicos descritos nos probandos.....	60
Figura 7	Faixa etária do paciente mais jovem com CCR na família.....	63
Figura 8	Frequência de tumores extracolônicos relacionados à SL encontrados nos familiares.....	64
Figura 9	Número total de tumores por família.....	67
Figura 10	Frequência de mutação em gene de reparo.....	70
Figura 11	Frequência de mutações patogênicas nos genes estudados.....	71

Figura 12	Tipo de mutação detectada.....	73
Figura 13	Ilustra uma mutação encontrada no gene MLH1 no exon 19 do tipo nonsense com troca de C por T no códon 2224 modificando o aminoácido Glicina por um Stop codon e uma terminação prematura da proteína.....	76
Figura 14	Mostra exemplo de mutação do tipo frameshift com deleção e A na posição de códon 1666 havendo troca de leucina desta posição e stop codon adiante por troca na fase de leitura (frameshift) e interrupção de leitura e terminação prematura da proteína.....	76
Figura 15	Ilustra uma mutação missense no códon 2027 houve uma troca de T por C com a troca de um único aminoácido de leucina por prolina.....	77
Figura 16	Ilustra uma mutação em sítio de splicing.....	77
Figura 17	Ilustra mutação com deleção.....	77

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Critérios de Amsterdam I.....	7
Quadro 2	Critérios de Amsterdam II.....	7
Quadro 3	Critérios de Bethesda.....	8
Quadro 4	Critério de Bethesda revisado.....	9
Tabela 1	Manifestação imunoistoquímica de proteínas de reparo relacionado com gene mutado.....	25
Tabela 2	Distribuição de acordo com os critérios clínicos das famílias.....	38
Tabela 3	Distribuição das famílias registradas no RCCH (até dezembro de 2005).....	40
Tabela 4	Variável demográfica dos probandos conforme o gênero.....	49
Tabela 5	Variáveis clínicas e anatomopatológicas do CCR dos probandos	51
Tabela 6	Variáveis relativas aos adenomas nos probandos.....	52
Tabela 7	Tumores extracolônicos relacionados aos probandos.....	53
Tabela 8	Numero de tumores malignos encontrado em pacientes probandos, incluindo os CCR e os tumores extracolônicos.....	54
Tabela 9	Estado dos probandos em relação ao CCR na última avaliação de seguimento.....	57

Tabela 10	Sobrevida global dos pacientes probandos tratados de CCR.....	58
Tabela 11	Sobrevida específica para o CCR em probandos.....	58
Tabela 12	Número de adenoma por probando.....	58
Tabela 13	Tumores extracolônicos encontrados nos probandos, todos mesmos os não pertencente à SL, excluído os tumores colorretais.....	60
Tabela 14	Número de gerações estudadas nas famílias.....	61
Tabela 15	Variáveis referentes aos familiares em famílias com suspeita de SL.....	62
Tabela 16	Número de CCR encontrado nas famílias.....	63
Tabela 17	Número de tumores extracolônicos relacionados à SL e CCR nas famílias.....	65
Tabela 18	Número de tumores de mama encontrado por família.....	65
Tabela 19	Todos os tumores encontrado nas famílias.....	66
Tabela 20	Relação número de familiares com tumor x total de familiares – Densidade de tumores na família.....	67
Tabela 21	Freqüência de alterações em proteínas de reparo estudadas em tumores dos probandos.....	68
Tabela 22	Combinações encontradas no estudo por IHQ para as proteínas de reparo nos tumores dos probandos.....	69

Tabela 23	Freqüência de resultados em pesquisa de microssatélites em tumores de probandos com suspeita de SL.....	69
Tabela 24	Freqüência de mutação em genes de reparo.....	70
Tabela 25	Freqüência de mutações encontradas em genes de reparo.....	71
Tabela 26	Freqüência dos tipos de mutações encontradas em genes de reparo.....	72
Tabela 27	Mutação novas detectadas.....	73
Tabela 28	Determinação de patogenicidade.....	74
Tabela 29	Correlação entre os achados de IHQ com os achados de mutação em genes de reparo.....	74
Tabela 30	Correlação entre os achados de instabilidade de microssatélites com os de mutação em genes de reparo.....	75
Tabela 31	Relação das mutações encontradas, localização, tipo e a definição da patogenicidade.....	78
Tabela 32	Correlação de variáveis clínicas e patológicas do CCR eadenomas dos probandos com os achados de mutações em genes de reparo.....	80
Tabela 33	Correlação de tumores extracolônicos dos probandos com os achados de mutações em genes de reparo.....	81
Tabela 34	Correlação de variáveis referentes às famílias com os achados de mutações em genes de reparo.....	82

Tabela 35	Correlação de variáveis imunoistoquímica e de instabilidade de microssatélites do CCR com os achados de mutações em genes de reparo.....	83
Tabela 36	Correlação de dados demográficos, e os relativos ao CCR e adenoma dos probandos com achados de mutação em gene MSH.....	84
Tabela 37	Correlação de tumores extracolônicos em probandos com achados de mutação em gene MSH2.....	85
Tabela 38	Correlação de dados relativos às famílias com achados de mutação em gene MSH2.....	86
Tabela 39	Correlação de dados relativos à imunoistoquímica e instabilidade de microssatélites do CCR os com achados de mutação em gene MSH2.....	87
Tabela 40	Correlação de dados clínicos e patológicos do CCR e adenoma dos probandos com mutação em gene MLH1.....	88
Tabela 41	Correlação dos tumores extracolônicos dos probandos com mutação em gene MLH1.....	89
Tabela 42	Correlação de dados familiares com mutação em gene MLH1....	90
Tabela 43	Correlação de dados imunoistoquímica e de instabilidade de microssatélites com mutação em gene MLH1.....	91

LISTA DE ABREVIATURAS

A	Adenina
ADP	Adenosina difosfato
ATP	Adenosina trifosfato
ATPase	Adenosina trifosfatase
AG	Adenina-guanina
AFAP	Polipose adenomatosa familiar atenuada
AFC	Agregação familiar de câncer
C	Citosina
CA	Citosina-guanina
CA-125	Marcador tumoral CA-125
CCB	Critério de Bethesda
CCF	Câncer colorretal familiar
CCR	Cancer colorretal
CP	Cabeça e pescoço
DNA	Ácido deoxirribonucleico
EDA	Endoscopia digestiva alta
FAP	Polipose adenomatosa familiar
G	Guanina
GT	Guanina-timina
HE	Hematoxilina-eosina
HNPCC	Câncer colorretal hereditário sem polipose
ICG/HNPCC	<i>International Collaborative Group / HNPCC</i>
IHQ	Imunoistoquímica
InSiGHT	<i>International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors</i>
MLH1	<i>Human mutL homolog 1</i>
MLH3	<i>Human mutL homolog 3</i>
MMR	<i>Mismatch repair</i>
MSH2	<i>Human mutS homolog 2</i>
MSH6	<i>Human mutS homolog 6</i>

MSI	Instabilidade de microssatélites
MSI-H	MSI <i>high</i>
MSI-L	MSI <i>low</i>
n.	Número
NCI	<i>National Cancer Institute</i>
ns	Não significativa (estatístico)
PMS1	<i>Human postmeiotic segregation 1</i>
PMS2	<i>Human postmeiotic segregation 2</i>
RCCH	Registro de Câncer Colorretal Hereditário
RER	Erros de replicação
RNA	Ácido ribonucléico
RR	Risco relativo
SL	Síndrome de Lynch
SLD	Sobrevida livre de doença
SNC	Sistema nervoso central
T	Timina
TNM	Sistema de estadiamento TMN (tumor, linfonodo e metástase)
US	Ultrassonografia

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer colorretal	2
1.2	Síndrome de Lynch	4
1.3	Aspectos clínicos na SL.....	12
1.3.1	Tumores colorretais.....	12
1.3.2	Tumores extracolônicos.....	15
1.3.3	Diagnóstico diferencial	16
1.4	Aspectos anatomopatológicos.....	17
1.5	Aspectos moleculares e genéticos	19
1.6	Instabilidade de microssatélites.....	22
1.7	Expressão imunoistoquímica.....	24
1.8	Seqüenciamento dos genes de reparo.....	25
1.9	Genes de reparo de DNA	26
1.10	Correlação genótipo-fenótipo	27
1.11	O sistema de reparo do DNA.....	28
1.12	Seguimento do pacientes de risco.....	30
1.13	Tratamento de indivíduos com câncer e SL	31
1.14	Justificativa do estudo	32
2	OBJETIVOS	34
2.1	Objetivo Geral.....	35
2.2	Objetivos secundários	35
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1	Crterios de Inclusão.....	39
3.2	Registro e Câncer Colorretal Hereditário.....	39
3.3	Procedimentos.....	40
3.4	Dados moleculares.....	41
3.4.1	Seqüenciamento dos genes de reparo.....	41

3.4.2	Imunoistoquímica para as proteínas de reparo	45
3.4.3	Instabilidade de microssatélites	45
3.5	Análise Estatística	46
3.6	Aspectos Éticos	47
4	RESULTADOS.....	48
4.1	Caracterização clínica	49
4.1.1	Pacientes probandos	49
4.1.2	Famílias	61
4.2	Resultados moleculares	68
4.2.1	Imunoistoquímica	68
4.2.2	Instabilidade de microssatélites	69
4.2.3	Seqüenciamento de genes de reparo.....	70
4.3	Correlações	79
4.3.1	Correlação com mutação em genes de reparo.....	79
4.3.2	Correlação com mutação em gene MSH2.....	83
4.3.3	Correlação com mutação em gene MLH1	87
5	DISCUSSÃO	92
6	CONCLUSÃO	106
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

ANEXO

Anexo 1 História familiar e resultado de mutação

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado uma doença genética, resultado de acúmulo de defeitos sucessivos no genoma que promovem uma vantagem seletiva do tecido neoplásico frente ao normal, e se caracteriza por um comportamento agressivo. A grande maioria dos cânceres tem origem esporádica, determinada por mutações somáticas, ou seja, adquiridas ao longo da vida, e menos de 10% são hereditárias. Nestas, as alterações são transmitidas hereditariamente determinadas por mutações em genes específicos e resultam em elevado risco de desenvolvimento de câncer e transmissão de geração a outra.

1.1 CÂNCER COLORRETAL

O câncer colorretal (CCR) é o quarto tumor mais comum em incidência no mundo, após os de mama, próstata e pulmão com uma incidência estimada em 2008 de mais de 1.200.000 casos novos (GLOBOCAN 2008). O adenocarcinoma colorretal representa mais de 90% dos tumores malignos que acometem o intestino grosso. No Brasil, segundo o Instituto Nacional do Câncer, a estimativa para o ano de 2010 é de 29.110 casos novos de CCR, sendo 13.310 em homens e 14.800 em mulheres (Ministério da Saúde 2009). Nas regiões mais desenvolvidas do país, sul (incidência de 20/100.000) e sudeste (incidência de 19/100.000), chegam a

apresentar uma incidência estimada de até 5 vezes a das menos desenvolvidas, nordeste (incidência de 5/100.000) e no norte (incidência de 4/100.000). Nas áreas mais desenvolvidas do Brasil representam o terceiro tumor mais freqüente no homem e o segundo na mulher (Ministério da Saúde 2009).

Apesar dos indiscutíveis avanços nas práticas clínicas e cirúrgicas no tratamento do CCR, a taxa de mortalidade pouco se alterou nos últimos 40 anos e a sobrevida global após 5 anos se mantém em cerca de 50% (GLOBOCAN 2008). A melhoria nos métodos de rastreamento e de detecção precoce surtem melhores efeitos com a detecção dos tumores em estádios mais precoces e neste sentido a identificação de famílias de elevado risco para tumores, como no caso de tumores hereditários, é uma prática eficaz na redução na mortalidade por câncer.

Os tumores colorretais podem ser classificados de acordo com o histórico familiar em: esporádicos, familiar e hereditário. A forma esporádica da doença, naquela em que não se verifica predisposição hereditária ou familiar, representa cerca de 75% a 80% dos casos de câncer colorretal, com idade de diagnóstico em torno de 65 anos. Nestes casos, os danos ao DNA são supostamente causados pela interação com o meio ambiente, em especial fatores dietéticos ou pelos efeitos do envelhecimento tecidual, sendo as alterações genéticas de origem somática. Com uma incidência de 15 a 20% encontra-se o grupo de tumores denominados de familiar, no qual se observa um aumento no número de indivíduos com CCR dentro da família, mas sem critérios para estabelecer como doença hereditária

reconhecida. Estes podem ser determinados por fatores hereditários por genes de baixa penetrância ainda desconhecidos, compartilhamento de fatores ambientais comuns na família ou genes que aumentam a suscetibilidade ao câncer, como alguns polimorfismos. O restante de cerca de 5% a 10% dos tumores colorretais representam os tumores de origem hereditária conhecida, determinado por genes de transmissão em sua maioria autossômica dominante, de elevada penetrância.

1.2 SÍNDROME DE LYNCH

Em torno de 6% dos pacientes com câncer colorretal apresentam predisposição hereditária (FEARNHEAD et al. 2002), sendo que as principais síndromes hereditárias relacionadas ao aparecimento de tumores colorretais são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), caracterizada por um grande número de pólipos adenomatosos ao longo do intestino grosso, e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC), também conhecido como Síndrome de Lynch (SL), que é caracterizada pela presença de um reduzido número de pólipos e aparecimento de tumores colorretais em idade precoce. A FAP é responsável por cerca de 1% dos casos de câncer colorretal e a SL entre 3% e 5% (LYNCH et al. 1999, 2003; DE LA CHAPELLE 2005; MECKLIN 2008). Estima-se uma incidência de 1/2.000 a 1/660, embora acredite-se que estes números sejam subestimados pela falta de acurácia no diagnóstico e pela penetrância incompleta da doença (DE LA CHAPELLE 2005).

Não existem dados sobre a incidência de HNPCC no Brasil, porém, se considerarmos uma incidência de 5% dos CCR, teremos cerca de 1.450 casos novos, pertencentes a famílias de HNPCC estimado para o ano de 2010 no país, levando se em conta os dados do Ministério da Saúde (2009).

Apesar do uso sem distinção dos termos HNPCC e SL, existe atualmente a tendência a utilização do termo SL para as famílias com confirmação molecular desta condição, enquanto que o termo HNPCC tem um sentido menos específico, definido por critérios clínicos, como por exemplo os de Amsterdam. Pode-se ainda denominar este último grupo em famílias com estudo molecular, mas sem detecção de mutação em genes de reparo como Síndrome X (LINDOR et al. 2005).

O conhecimento das bases moleculares do HNPCC obteve um grande avanço nas últimas 2 décadas, com a descoberta dos genes responsáveis. Hoje sabemos que se trata de uma doença hereditária, autossômica dominante, com uma penetrância de cerca de 80%, caracterizada por um pequeno número de pólipos, e por tumores localizados predominantemente no lado direito do cólon. Embora, as pessoas acometidas por esta síndrome apresentem um número reduzido de pólipos, estes, geralmente, apresentam uma elevada taxa e velocidade de transformação e progressão para o câncer (RIJCKEN et al. 2002).

Esta síndrome está associada a mutações germinativas em um grupo de genes responsáveis pelo reparo do DNA durante o processo de divisão celular: *MSH2* (*human mutS homolog 2*), localizado no cromossomo 2p16 (FISHEL et al. 1993; LEACH et al. 1993); *MLH1* (*human mutL homolog 1*),

no 3p21 (BRONNER et al. 1994 PAPADOPOULOS et al. 1994); *PMS1* (*human postmeiotic segregation 1*), no 2q31-33 (NICOLAIDES et al. 1994); *PMS2* (*human postmeiotic segregation 2*), no 7p22 (NICOLAIDES et al. 1994) e *MSH6/GTBP* (*human mutS homolog 6*), no 2p16 (DRUMMOND et al. 1994; PALOMBO et al. 1995).

Células com o mecanismo de reparo defeituoso têm uma probabilidade cerca de 1.000 vezes maior de acumular mutações, acelerando, conseqüentemente, o processo de múltiplos passos da carcinogênese dos tumores colorretais (BHATTACHARYYA et al. 1994; SHIBATA et al. 1994).

Embora grandes avanços na compreensão das bases moleculares da SL tenham ocorrido nas décadas anteriores, o diagnóstico ainda continua eminentemente clínico. Além disto como não existem sinais ou manifestações que identifiquem os pacientes portadores da doença (com a mutação genética) antes do aparecimento do câncer, de maneira que os dados clínicos do paciente e de sua história familiar adquirem importância fundamental (CHIALINA et al. 2006). Em 1991, o Grupo Colaborativo Internacional (ICG/HNPCC) publicou os chamados Critérios de Amsterdam I (VASEN et al. 1991), com a intenção de promover uma padronização internacional no diagnóstico clínico do HNPCC. (Quadro 1)

Quadro 1 - Critérios de Amsterdam I.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR;
- um dos membros parente em primeiro grau dos outros dois;
- pelo menos duas gerações acometidas;
- pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP).

Os Critérios de Amsterdam I tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico de HNPCC, porém, foram criticados por serem muito restritivos, com baixa sensibilidade, e por não considerarem os tumores extracolônicos. Por isso, em 1999, o mesmo ICG/HNPCC acrescentou aos critérios de 1991 novos itens para o diagnóstico clínico, criando desta forma os Critérios de Amsterdam II (VASEN et al. 1999) (Quadro 2).

Quadro 2 - Critérios de Amsterdam II.

- Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR;
- um dos membros parente em primeiro grau dos outros dois;
- pelo menos duas gerações acometidas;
- pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- exclusão de polipose adenomatosa familiar (FAP);
- adenocarcinoma de endométrio;
- adenocarcinoma de intestino delgado;
- carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais (pelve renal e ureter).

O espectro de diagnóstico da SL foi ampliado com os Critérios de Amsterdam II, entretanto, ainda existem críticas, principalmente devido à dificuldade de diagnóstico clínico em famílias pequenas, com poucos membros, fato este comum em países do primeiro mundo.

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

Em 1996, após um simpósio internacional sobre HNPCC foi proposta uma série de recomendações, conhecidas como Critérios de Bethesda (Quadro 3), para a identificação de indivíduos com forte suspeita de SL que deveriam ser submetidos à avaliação de instabilidade de microssatélites e/ou teste genético (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997).

Quadro 3 - Critérios de Bethesda.

- Indivíduos que preenchem os Critérios de Amsterdam;
- Indivíduos com dois tumores relacionados à síndrome, incluindo CCR sincrônico e metacrônico ou associado a tumores extracolônicos;
- tumores extracolônico relacionado à síndrome e/ou adenoma colorretal; um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos;
- Indivíduos com CCR ou câncer endometrial diagnosticado antes de 45 anos; (sólido/cribiforme) antes dos 45 anos;
- Indivíduos com CCR com células em anel de sinete diagnosticado antes dos 45 anos;
- Indivíduos com adenomas diagnosticados antes dos 40 anos.

Posteriormente, em 2004, os Critérios de Bethesda foram revisados em *workshop* do *National Cancer Institute*, conforme apresentado no Quadro 4 (URSO et al. 2008).

Quadro 4 - Critério de Bethesda revisado

- CCR diagnosticado em paciente com menos de 50 anos;
- Presença de CCR sincrônico ou metacrônico ou outro tumor extracolônico associado a síndrome, independente da idade;
- CCR com histologia MSI-H* diagnosticado em paciente com menos de 60 anos;
- CCR diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com tumor relacionado à síndrome, com um dos tumores tendo sido diagnosticado antes dos 50 anos;
- CCR diagnosticado em um ou mais parente de primeiro ou segundo graus com tumores relacionados à síndrome, independente da idade.

* A histologia MSI-H representa a presença de linfócitos infiltrando o tumor, reação linfocítica *Crohn-like*, diferenciação mucinosa ou em anel se sinete ou padrão de crescimento medular.

Pacientes com diagnóstico suspeito de HNPCC, segundo os Critérios de Bethesda, têm indicação de pesquisa de instabilidade de microssatélites em tecido tumoral, uma vez que este achado é um indicador fenotípico de defeitos no sistema de reparo do DNA (BOLAND et al. 1998). O fato de mais de 90% dos cânceres relacionados à SL exibirem instabilidade de microssatélites sugere que esta técnica possa ser uma arma eficiente no rastreamento e identificação de indivíduos com elevada chances de serem portadores de defeitos no sistema de reparo do DNA e, portanto, se alterado, com recomendação de se submeterem ao teste genético através do seqüenciamento (AALTONEN et al. 1998; WIJNEN et al. 1998; LAMBERTI et al. 1999; SALOVAARA et al. 2000; SAMOWITZ et al. 2001). Entretanto uma parcela de 10 a 15% dos pacientes com tumores colorretais esporádicos também apresentam este achado como resultado de alteração epigenética, por metilação no promotor do gene *MLH1* (CUNNINGHAM et al. 1998; LINDOR et al. 2006; LOUGHREY et al. 2007). Os tumores

esporádicos com MSI-H tem sido associado com mutação somática de gene *BRAF* (mutação específica V600), mas não é encontrada nos pacientes com HNPCC, podendo servir como método de identificação dos pacientes sem mutação germinativa em gene de reparo. Para tanto realiza-se a avaliação de mutação específica de *BRAF* (V600E) (LOUGHREY et al. 2007; BESSA et al. 2008).

Por outro lado, a grande maioria das mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* resultam em expressão anormal das respectivas proteínas nos tecidos tumorais (THIBODEAU et al. 1996, 1998; CUNNINGHAM et al. 2001), portanto, uma outra arma diagnóstica importante é a realização de testes por imunistoquímica da expressão das proteínas de reparo. A pesquisa de alterações nas proteínas *MLH1* e *MSH2*, através da imunistoquímica, no tecido tumoral de pacientes suspeitos de HNPCC tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento para posterior indicação do seqüenciamento dos genes. As outras proteínas de reparo, *PMS2* e o *MSH6* também são utilizados com o mesmo propósito. Uma outra vantagem do método é o direcionamento da pesquisa um gene específico por seqüenciamento conforme os achados de imunistoquímica. PIÑOL et al. (2005) analisaram 287 pacientes da população espanhola que preenchem os critérios de Bethesda e sugerem que tanto a análise de microssatélites quanto o teste por imunistoquímica possuem uma alta acurácia em identificar dentre os pacientes com suspeita de HNPCC os portadores de alterações nos genes *MLH1* e *MSH2*.

Nos casos positivos para instabilidade de microssatélites ou alterações na imunoistoquímica é indicada a realização do seqüenciamento dos genes de reparo *MLH1* e *MSH2*, estes responsáveis por até 60% dos casos de HNPCC (PELTOMÄKI et al. 1997; JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). Esses números têm uma alta variabilidade na literatura, mas acredita-se que esses dois genes sejam os principais causadores da síndrome. Além disto cerca de 2% a 10% das famílias com SL apresentam mutações no gene *MSH6* (KOLODNER et al. 1999), portanto, caso o resultado do seqüenciamento dos genes *MLH1* e *MSH2* sejam normais em uma dada família com suspeita clínica de SL, o seqüenciamento do gene *MSH6* deve ser considerado. O gene *PMS2* é descrito como mutado esporadicamente nas famílias com HNPCC (PAPADOPOULOS et al. 1994) podendo ser responsável por cerca de 2 a 5% dos casos de HNPCC, podendo também ser estudado na sequência.

Uma vez identificado, através do seqüenciamento, o defeito genético em um indivíduo índice, pertencente a família que preenche os critérios clínicos para HNPCC a pesquisa dessa mesma mutação pode ser estendida para os demais membros e identificar, entre os indivíduos assintomáticos, aqueles que são portadores da predisposição ao câncer. Com isso, a indicação dos exames habituais de rastreamento, como a colonoscopia, fica restrita aos indivíduos portadores da predisposição e os demais membros da família, com teste negativo, sem detecção da predisposição genética, ficam liberados do seguimento. Outro ponto de extrema importância para a realização do teste de predisposição é o planejamento familiar, pois a

probabilidade de transmissão do defeito genético é de 50% nos casos em que um dos pais seja portador da mutação. Quando não há a caracterização molecular da alteração genética, não se pode rastrear na família os membros assintomáticos portadores da predisposição e, nessa situação, todos os familiares continuam sob suspeita de possuir a predisposição ao câncer, e, conseqüentemente, devem prosseguir com todos os exames de prevenção. Nesta situação o teste molecular é denominado de inconclusivo, pois podem existir outros genes envolvidos (ainda desconhecidos) ou haver alterações não detectadas pelos métodos utilizados. No caso do seqüenciamento alguns tipos de alterações não são detectadas como é o caso das grandes deleções, rearranjos genômicos e das duplicações de DNA, sendo que são todos considerados raros na SL.

1.3 ASPECTOS CLÍNICOS NA SL

1.3.1 TUMORES COLORRETAIS

Os pacientes com a SL apresentam risco aumentado de tumores colorretais com uma taxa que varia de 50 a 80% ao longo da vida. Os tumores são de localização preferencial em cólon direito, proximal ao ângulo esplênico, isto ocorrendo em 70% dos pacientes com SL, enquanto que no caso de tumores esporádicos isto ocorre em 49% (LYNCH e DE LA CHAPELLE 1999). Há uma tendência aos tumores múltiplos no intestino grosso podendo ocorrer de forma sincrônica em 18,1% comparado com a taxa de 1% para os esporádicos. Os tumores colorretais múltiplos

metacrônicos ocorre em 24,2% na SL, comparados com 5% nos tumores esporádicos, podendo chegar a 40% em seguimento de 10 anos. A média de idade de acometimento por CCR na SL é de 45 a 46 anos (FITZGIBBONS et al. 1987). Observa-se uma menor taxa de tumores mais distais, em sigmóide e reto na SL de 23,3% versus 60% nos esporádicos (FITZGIBBONS et al. 1987).

Mesmo com conhecimento das características clínicas dos CCR na SL o reconhecimento da síndrome pode não ser fácil, em especial quando não há um histórico na família tão exuberante. Além disto existe a possibilidade da mutação *de novo* (STULP et al. 2006), ainda não muito bem estabelecida a freqüência na literatura para SL, em que o caso índice pode ser a uma mutação nova, que tenha dado origem dentro da família, sem um histórico prévio na família.

Uma outra característica apontada na maioria dos estudos para a SL é a melhor sobrevivência dos pacientes com CCR. Isto é observado mesmo ajustando os tumores com idade e estágio ao diagnóstico (WATSON et al. 1998; ELSAKOV e KURTINAITIS 2006). Tem se observado menor de incidência de metástases hematogênicas e de comprometimento linfonodal relacionados aos CCR na SL (JASS et al. 1994). SANKILA et al. (1996) comparando CCR na SL com os esporádicos mostrou sobrevida em 5 anos respectivamente de 65% contra 44%. Por outro lado, as características histopatológicas dos tumores relacionado a SL são contraditoriamente relacionados com pior prognóstico, como por exemplo, a maior freqüência de tumores indiferenciados, mucinosos e em anel de sinete (DRESCHER et al.

2010). As hipóteses para esta melhor sobrevivência os pacientes com SL, também em comum com os tumores esporádicos com instabilidade de microssatélites, está relacionado com aumento de infiltração por células T possivelmente por mecanismos inflamatórios e imunológicos (FISK et al. 1997; BENNETT et al. 1998; DOLCETTI et al. 1999; DRESCHER et al. 2009), redução da viabilidade das células tumorais devido a instabilidade genômica que determinaria o acúmulo de mutações que tornaria a sobrevivência das células tumorais incompatíveis (SANKILA et al. 1996; RHYU 1996) e a natureza diplóide dos tumores relacionados à SL (KOURI et al. 1990; FREI 1992). SAMOWITZ et al. (2001) demonstraram o valor prognóstico da condição do tumor com MSI-H estavam associados com presença de linfócitos citotóxicos ativos em tecido tumoral. Este fato deu suporte à hipótese de que estes tumores podem continuamente produzir novos epitopos imunogênicos como consequência de instabilidade do genoma causado por defeito no sistema de reparo. A resposta imunológica mais ativada determinaria uma melhor resposta do hospedeiro frente ao tumor.

Estudos retrospectivos e prospectivos comparando os pacientes com MSI-H com a utilização de quimioterapia com 5-Fluorouracil (5-FU) com os sem esta droga indicaram que os pacientes MSS com estágio clínico II e III se beneficiam da QT, enquanto que os MSI-H não se beneficiaram (RIBIC et al. 2003). O sistema de reparo intacto é necessário para a incorporação do 5FU no DNA celular e determinar a morte celular (CARETHERS 2006).

As manifestações na forma de CCR nos pacientes com SL apresentam também influência de fatores ambientais como a dieta,

tabagismo e o estilo de vida. Pacientes com aumento de consumo de frutas apresentam um redução do risco e o hábito de tabagismo na SL apresenta um aumento no risco de desenvolvimento de tumores (BRAND et al. 2006; DIERGAARDE et al. 2007; PANDE et al. 2010). Paciente com aumento de índice de massa corpórea apresentam um risco maior de adenomas colorretais em especial no homem (BOTMA et al. 2010).

1.3.2 Tumores extracolônicos

Os tumores extracolônicos associados com a SL são: adenocarcinoma de endométrio, ovário, intestino delgado, estômago, pâncreas, trato hepatobiliar, carcinoma de células transicionais de pelve renal e ureter e tumores do sistema nervoso central (SNC). A síndrome de Muir Torre foi inicialmente descrita na década de 1960, que constitui em lesão de pele do tipo adenoma sebáceo, epitelomas, carcinomas sebáceos ou queratoacantoma associado com uma malignidade interna é atualmente considerada uma variante da SL (COHEN et al. 1991; CHEN et al. 2003). Os tumores de endométrio são considerados o segundo mais freqüente na SL, após o CCR, com um risco de desenvolvimento que varia de 50 a 60% ao longo da vida de uma mulher. Em algumas situações o câncer de endométrio é a primeira manifestação da SL, antes do aparecimento do CCR em até 35% das mulheres (WATSON et al. 1994; AARNIO et al. 1995), podendo em algumas famílias suplantar a incidência de CCR. O risco para tumores de ovários é de 10% em mulheres com SL (AARNIO et al. 1995). Os demais tumores do espectro da SL devem apresentar uma incidência de

menos de 15% (WATSON e LYNCH 1993; AARNIO et al. 1999). Podem ocorrer variações regionais na incidência dos tumores relacionados com a SL, como ocorre por exemplo com os tumores gástricos, que são mais prevalentes em regiões de elevada incidência destes tumores como na China (CAI et al. 2003; ZHANG et al. 2005; WANG et al. 2006), Coréia (PARK et al. 2000) e Argentina (VACCARO et al. 2007).

Outros tumores não relacionados como ligados a SL estão são descritos isoladamente associado com alterações sugestivas como a instabilidade de microssatélites e ausência de expressão de proteínas de reparo, como por exemplo linfoma não Hodgkin (PINEDA et al. 2008), sarcoma (HIRATA et al. 2006) mama (WESTENEND et al. 2006; WALSH et al. 2010; JENSEN et al. 2010). Alguns tumores surgem como acima do esperado para a população em questão como por exemplo tumores de tireóide e próstata (MAUL et al. 2006; GRINDEDAL et al. 2009).

1.3.3 Diagnóstico diferencial

O diagnóstico diferencial deve ser realizado com outras síndromes hereditárias relacionadas com aumento de risco para CCR, em particular com a polipose adenomatosa familiar atenuada (AFAP) e a polipose recessiva (relacionado ao gene *MYH*). A primeira apresenta um número reduzido de pólipos no cólon e risco aumentado de CCR, em especial em cólon direito como na SL. É causada por mutação em gene supressor de tumor, o *APC*, em sítios distintos da FAP clássica. A polipose recessiva também se caracteriza por um número reduzido de pólipos distribuídos no

intestino grosso com risco aumentado de tumores de cólon e reto. São causados por mutação no gene *MYH*. A presença de mais do que 10 a 15 adenomas em um indivíduo com SL é pouco usual e pode sugerir síndromes relacionadas com a polipose como a AFAP ou relacionado ao gene *MYH* (LYNCH et al. 1995; CAO et al. 2002).

1.4 ASPECTOS ANATOMOPATOLÓGICOS

O CCR relacionado com a SL apresentam maior freqüência de tumor mucinoso, em anel de sinete, pouco diferenciado, com infiltração linfocitária, reação linfocítica semelhante à doença de Chron (*Chron's like*) e padrão de crescimento medular ou cribiforme (JASS et al. 1994). O infiltrado linfocitário intra-epitelial parece ser o fator mais sensível e pode ser avaliado através de estudo em HE (hematoxilina-eosina) de rotina (SMYRK et al. 2001; JENKINS et al. 2007). As características histopatológicas citadas são comuns também aos tumores esporádicos que apresentam instabilidade de microssatélites.

Os adenomas colorretais ocorrem em uma idade inferior ao observado na população geral, porém, com maior risco e velocidade de transformação para carcinoma (LANSPA et al. 1994; JASS et al. 2002). O tempo estimado para a progressão de um adenoma para carcinoma no caso de tumores esporádicos é de 5 a 10 anos. No caso da SL esse tempo pode ser abreviado para menos de 2 anos. A razão da transformação do adenoma para carcinoma na SL é de praticamente 1:1 enquanto que na população geral é de 1:30 (FISHEL 2001). Há também uma tendência na SL de

apresentar adenomas mais agressivos na SL com maior grau de displasia e maior tendência a apresentação do componente viloso em detrimento do tubular nos adenomas. Conforme estudo realizado por SANKILA et al. (1996) ficou claro que a realização de colonoscopia em pacientes de risco para SL permite a prevenção de 1 CCR para cada 2,8 pólipos adenomatosos removidos. A realização de colonoscopia em intervalos inferiores a 2 anos para prevenção é recomendável para pacientes suspeitos para HNPCC, não sendo raros, mesmo com este cuidado, a detecção de lesões transformadas em intervalos de até 1 ano, geralmente tumores iniciais, denominadas de câncer de intervalo (DE JONG et al. 2006a; DOVE-EDWIN et al. 2006a e b). A taxa de prevenção na população geral é de 1 CCR para cada 41 a 119 polipectomias realizadas (WINAWER et al. 1993). A análise de adenomas relacionados com a SL tem mostrado elevada incidência de deficiência de proteínas de reparo por técnicas de imunohistoquímica, variando de 60 a 90% (WATANABE et al. 1996; IINO et al. 2000; RIJCKEN et al. 2002; DE JONG et al. 2004; GIUFFRÈ et al. 2005; HALVARSSON et al. 2005). Um outro aspecto observado em relação aos adenomas em SL é o fato de apresentarem uma elevada frequência de instabilidade de microssatélites e perda de expressão de proteínas de reparo (MÜLLER et al. 2006b). Um outro aspecto em comum com os CCR nos adenomas colorretais da SL é o aumento de infiltrado linfocitário em comparação com os pólipos esporádicos (MEIJER et al. 2009).

A realização de colonoscopia com cromoscopia ou com sistema de NBI para melhorar a detecção de lesões pequenas e planas aumentam

significativamente os achados de lesões adenomatosas na SL (HURLSTONE et al. 2005).

1.5 ASPECTOS MOLECULARES E GENÉTICOS

Os primeiros conhecimentos relativos ao aspectos moleculares da SL surgiram no início da década de 1990, com a identificação de um provável locus no cromossomo 2p através de análise de ligação (PELTOMÄKI et al. 1997). Um segundo sítio foi localizado no cromossomo 3p na mesma época (LINDBLUM et al. 1993). Foi observado que nos tumores de pacientes com SL apresentavam uma característica já observada em alguns tumores esporádicos, denominados de fenótipo de erros de replicação (RER), conhecido também como instabilidade de microssatélites (MSI). A correlação destes achados como causados por defeitos no sistema de reparo de DNA levou a descoberta dos dois genes mais importantes relacionados à SL, o *MSH2* e *MLH1* respectivamente nos loci 2p22 e 3p22. Os dois genes respondem por 85 a 90% das mutações relacionadas com a SL (GOECKE et al. 2006). Na seqüência foram identificados outros genes envolvidos no sistema de reparo do DNA que podem estar associados: loci 2q31-33 do gene *PMS1*; 7p22 do gene *PMS2*; e o loci 2p16 do gene *MSH6* (PALOMBO et al. 1995; DRUMMOND et al. 1994). Outros genes relacionados como o *MLH3* e o *EXO1* descritos, não têm a sua relevância esclarecida até o momento (LAGERSTEDT et al. 2007; BACKES et al. 2009). A freqüência de mutações relacionadas com mutação no gene *MSH6* tem variado conforme

o estudo de 2 a 16%, sendo que em média tem respondido por 10% casos de SL (DOVRAT et al. 2005).

Os genes de reparo de DNA apresentam um comportamento semelhante aos genes supressores de tumor em que há necessidade de inativação somática do segundo alelo (selvagem) para que ocorra inativação de sua função, conforme a teoria de KNUDSON (1971). Os indivíduos afetados herdam a mutação defeituosa de um dos pais com a doença, recebendo um alelo defeituoso que estará presente em todas as células do organismo. Entretanto, a manifestação da doença não se faz ao nascimento e nem na infância, o que significa que o alelo normal (selvagem) é capaz de manter a funcionalidade do sistema de reparo de DNA. Para que ocorra a perda dessa função reparadora exercido pelo alelo selvagem deve ocorrer a sua inativação. Esta inativação somática (conhecida como *second hit*) pode ocorrer por diferentes mecanismos: deleção (perda da heterozigidade LHO) (HEMMINKI et al 1994; PAPADOPOULOS et al. 1994; PARSONS et al. 1995; OLLIKAINEN et al. 2007), por mutação (LIU et al. 1994), ou metilação de ilhas de CpGs no promotor de gene *MLH1* (KUISMANEN et al. 1999, 2000). Esta perda de função do segundo alelo ocorre ao longo da vida do indivíduo, explicando a ocorrência dos tumores em idade de adulto jovem, em idade inferior ao que ocorre para os tumores esporádicos. A perda da função da proteína de reparo é visualizada na maioria das vezes nos tumores dos indivíduos com a SL, através das alterações na imunohistoquímica, sendo um reflexo dessa perda ou alteração da proteína reparadora. Um outro aspecto que também é visualizado no tecido tumoral e

não em tecidos normais é a instabilidade de microssatélites, que é um fenômeno que se sucede, em consequência da perda do segundo alelo funcional e que da mesma forma é o determinante do desenvolvimento do tumor. Estas mudanças ocorridas causam o fenótipo mutador (RER) que permite o acúmulo de novas mutações e aumento na chance de desenvolvimento do câncer (LYNCH e SMYRK 1996).

Na mesma linha de raciocínio podemos em situações mais raras ter a mutação bialélica em genes de reparo. Há casos descritos que podem resultar de casamentos consangüíneos de famílias de SL, tendo como resultado a ocorrência de mutação nos 2 alelos, que determina o surgimento de neoplasias em idade ainda mais precoce, geralmente na infância. Observa-se algumas características distintas com a SL clássica, como o tipo de tumor observado, sendo os mais comuns os tumores do SNC e hematológicos (leucemia e linfoma), além de apresentarem algumas características que lembram a neurofibromatose como manchas tipo café com leite na pele. Estas alterações descritas podem resultar de mutação herdadas de ambos os pais portadores em um mesmo gene, sem que necessariamente seja a mesma mutação. Quando esta mutação é diferente em cada alelo de um gene de reparo é denominada como mutação heterozigótica bilalélica, e quando se trata de uma mesma mutação causando a inativação dos dois alelos é denominada de mutação homozigótica bilalélica. É uma condição rara, tendo sido descritos um número restrito de casos na literatura, mas é uma condição que deve estar presente no diagnóstico diferencial de pacientes com neoplasia na faixa

pediátrica associado a sinais de neurofibromatose (BANDIPALLIAM 2005; MÜLLER et al. 2006a; POLEY et al. 2007; FELTON et al. 2007; JACKSON et al. 2008; KRÜGER et al. 2008).

1.6 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

A mutação no sistema de reparo causam freqüentemente alterações nos microssatélites em cerca de 90% dos tumores estudados de pacientes com SL (DE LA CHAPELLE 2005). Os microssatélites são seqüências repetitivas de bases nucleotídicas, distribuídas pelo genoma de células eucarióticas, cuja função não está bem estabelecida, mas permite denunciar alterações no sistema de reparo através da detecção de sua instabilidade. Os microssatélites são portanto, seqüências de bases de localização intergênicas com repetições de um a cinco pares de bases podendo chegar a 200 pares de bases de extensão total (ALBERTS et al. 1999). Quando há repetição de uma única base são denominados de microssatélites mononucleotídicas, quando há duas bases são denominadas de dinucleotídicas e assim por diante até um conjunto de seis bases denominadas de hexanucleotídicas. A repetição de duas bases, CA, é a forma mais comumente encontrada, representando 0,5% do genoma. As repetições mononucleotídicas A e T representam 0,3% do genoma e as dinucleotídicas GT e AG representam 0,2%. São altamente polimórfica na população humana porém elas se mantêm estáveis durante toda a vida de um indivíduo normal, que não apresente alterações nos genes de reparo

(SAKURAI et al. 2007). Os microssatélites são regiões do genoma particularmente propensos a deslizamentos da DNA polimerase e desalinhamentos da dupla fita durante a replicação. Se estes danos não reparados nesta ocasião, causados por defeito no sistema de reparo, há perpetuação do erro, configurando uma mutação nas células resultantes que pode ser uma inserção ou a deleção de uma ou mais repetições a cada replicação havendo a modificação em comparação com o padrão normal do indivíduo (IMAI e YAMAMOTO 2008).

As alterações nos microssatélites são classificadas conforme a padronização definida pelo *National Cancer Institute* (NCI) utilizando um painel de 5 marcadores: dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT 26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346, D17S250). Quando há mais de 30% de marcadores alterados, são denominados de instabilidade de alta frequência (ou alto índice de instabilidade de microssatélites – MSI-H, na sigla em inglês), e quando menos de 30% está alterado são chamados de instabilidade de baixa frequência (ou baixo índice de instabilidade de microssatélites – MSI-L). São denominados de estável quando todos os marcadores se encontram normais (BOLAND et al. 1998; RANGEL et al. 2008). Considerando-se todos os tumores colorretais com MSI-H somente 20 a 25% apresentam mutação germinativa de genes de reparo. O restante, a grande maioria, está associada a tumores esporádicos como resultado de hipermetilação de promotor do gene *MLH1* em que são observados em 15% de todos os CCR esporádicos. Por outro lado em tumores relacionados com SL a alteração está presente em 90% dos casos. Embora seja um teste

sensível para SL, ela pode não estar presente em 5 a 10% dos pacientes com mutação em gene de reparo. A sensibilidade do MSI é particularmente menor para mutações em MSH6 (sensibilidade de 86%) (HENDRIKS et al. 2004).

1.7 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Os tumores relacionados à SL apresentam ausência de atividade da proteína de reparo correspondente à mutação herdada e perda da função adquirida por mutação somática do segundo alelo, determinando na imunohistoquímica a ausência da expressão proteica no tumor. O estudo por imunohistoquímica pode significar também uma importante ferramenta de diagnóstico, como comentado anteriormente. Alterações de imunohistoquímica serve de rastreamento da existência de mutação e de sua localização mais provável, e pode assim determinar o direcionamento do seqüenciamento para gene específico, conforme a alteração encontrada (BAUDHUIN et al. 2005; LAGERSTEDT et al. 2007).

As manifestações imunohistoquímicas, frente às mutações em genes de reparo, estão associado a funcionamento como heterodímeros e respeitam em geral a padrão apresentado na Tabela 1 (HENDRIKS et al. 2006b). As proteínas de reparo maiores, MSH2 e MLH1, são estabilizados pelos correspondentes menores que incluem o MSH6 e PMS2. Os genes menores dependem de sua ligação com seus pares para apresentar expressão da proteína. Com isso em tumores que perdem a expressão de

MSH2, há uma perda concomitante de MSH6. Similarmente ocorre com a perda de MLH1 e perda associada de PMS2. Quando há mutação específica de *MSH6* e *PMS2* ocorre perdas de expressão isolada das proteínas correspondentes (BOLAND et al. 2008).

Tabela 1 - Manifestação imunoistoquímica de proteínas de reparo relacionado com gene mutado.

Gene Mutação	Proteína de reparo			
	MSH2	MLH1	MSH6	PMS2
<i>MSH2</i>	(-)	(+)	(+)	(-)
<i>MLH1</i>	(+)	(-)	(+)	(-)
<i>HSH6</i>	(+)	(+)	(-)	(+)
<i>PMS2</i>	(+)	(+)	(+)	(-)

Fonte: Adaptado de HENDRIKS et al. (2006b)

1.8 SEQÜENCIAMENTO DOS GENES DE REPARO

O seqüenciamento dos genes de reparo de DNA é considerado como método padrão ouro com maior sensibilidade para diagnóstico de mutações germinativas (YUAN et al. 2006). O seqüenciamento do DNA consiste em métodos bioquímicos com a finalidade de determinar a seqüência exata das bases nitrogenadas adenina (A), timina (T), guanina (G) e citosina (C) da molécula de DNA. O método original foi proposto inicialmente por Frederick Sanger na década de 1970 (SANGER 1981). O método foi amplamente utilizado e atualmente o seqüenciamento é realizado de forma automatizada em aparelhos seqüenciadores. O seqüenciamento é realizado a partir de material biológico de um indivíduo que sabidamente é portador da síndrome, que apresente tumor característico, de preferência aquele mais jovem dentro

da família, onde a probabilidade de encontrar a mutação seja maior (LYNCH e SMYRK 1996).

1.9 GENES DE REPARO DE DNA

Os genes de reparo de DNA apresentam importante papel na manutenção da integridade do genoma, corrigindo erros na síntese de DNA, garantindo assim a fidelidade da replicação genética, assim como de participar dos passos iniciais de resposta apoptótica quando os danos do DNA não são passíveis de reparação (DA SILVA et al. 2009). Os principais genes que participam da SL são: *MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e o *PMS2*.

O gene *MLH1* está localizado no cromossomo 3p22.3, apresenta 19 exons com um total de 2.524 PB e uma proteína de 756 aminoácidos. O gene *MSH2* está localizado no cromossomo 2p22-21 com 16 exons com 3.145 PB e uma proteína de 934 aminoácidos. O gene *MSH6* localizado no cromossomo 2p16 com 10 exons e 1360 aminoácidos .

As principais alterações encontradas nos genes *MLH1* são *missense* (24% a 30%), *nonsense* (7%), *splicing* (13%) silenciosa (9%), pequenas inserções e deleções (22%) todas passíveis de detecção através do seqüenciamento (OU et al. 2007; MMR 2009). Os principais tipos de alterações encontradas no gene *MSH2* são: *missense* (17%), *nonsense* (10%), *splicing* (6%), silenciosas (9%) e as pequenas inserções e deleções (25%) (MMR 2009). As grandes deleções são mais comuns no gene *MSH2*

representando 33% e menos freqüente no *MLH1* (22%) e muito raras no *MSH6* (2%) (MMR 2009).

Embora o gene *PMS2* seja crucial no seu papel no reparo do DNA, raramente tem sido relacionado com a SL (HENDRIKS et al. 2006a).

1.10 CORRELAÇÃO GENÓTIPO-FENÓTIPO

Com os achados de mutações em diferentes genes responsáveis pelo reparo de DNA tem se procurado detectar uma correlação com as manifestações fenotípica do paciente e da família. As mutações nos genes *MSH2* predispõe mais aos tumores extracolônicos em comparação ao gene *MLH1*. As mutações no gene *MSH2* apresentam maior risco de tumores de endométrio em relação ao *MLH1*. As mutações em gene *MSH6* aumentam a predisposição aos tumores de endométrio (LYNCH et al. 2007; DEVLIN et al. 2008). O risco para mulheres com mutação em gene *MSH6* chega a ser a de duas vezes ao observado para os genes *MSH2* e *MLH1* (BARROW et al. 2006). Este mesmo estudo mostrou aumento de tumores de SNC relacionado com mutação em gene *MSH2*. Nos pacientes com mutação em *MSH6* o primeiro CCR tende a ser com idade mais avançada, com média de idade de 59 anos em comparação aos demais, *MSH2* e *MLH1* de 45 anos (GEARY et al. 2008). Neste estudo realizou a comparação de 130 pacientes com mutação identificada com um grupo controle de 723 pacientes com tumores na população geral. O RR para câncer de endométrio foi de 55 em mutação para *MSH2*, 37 para *MSH6* e 27 *MLH1* com uma tendência

agrupamento em determinadas famílias, sendo comuns famílias com 3 ou mais casos. Havia na casuística 13 casos de tumor de ureter todos relacionados com mutação em *MSH2*, RR para tumor de estômago foi de 12 com uma incidência de 5% dos pacientes com mutação distribuídos nos genes *MSH2* e *MLH1*. O RR para tumores do intestino delgado foi de 22 e também distribuído entre *MSH2* e *MLH1*. Em tumores de ovário 70% esteve relacionado com o gene *MSH2* (GEARY et al 2008). VAN DER POST et al. (2010) também relacionou os tumores uroteliais ao gene *MSH2* com maior frequência, 15/19 casos, ocorrendo em 90% dos casos em homens.

Em estudo amplo envolvendo 189 famílias com mutação em genes de reparo para avaliação de correlação com tumor de intestino delgado não se mostrou diferente quanto ao local de mutação em *MLH1* ou *MSH2* (TEN-KATE et al. 2007).

1.11 O SISTEMA DE REPARO DO DNA

O mecanismo de reparo do DNA tem um importante papel na estabilidade do genoma, corrigindo erros que eventualmente ocorram durante a replicação.

Os genes de reparo foram inicialmente estudados em *Escherichia coli* (*E. coli*) sendo um processo altamente conservado entre os seres vivos desde as bactérias até os mamíferos. Os homodímeros responsáveis pelo reparo nesta bactéria são denominados de MutS e MutL. O modelo proposto para a correção dos erros constitui em três passos básicos; reconhecimento

do erro e formação do reparossomo, degradação da fita de DNA contendo erro, e finalmente, realização do reparo. MutS é responsável pelo reconhecimento dos erros de pareamento e recruta o MutL para o local começando a atividade de reparo.

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 intermedia o reconhecimento do erro e o seu reparo. Na falta de PMS2 a proteína MLH3 é a que substitui formando o heterodímero com MLH1. O MutL γ é o complexo mais ativo nos seres humanos e realiza o reparo iniciado pelo complexo MutS.

As células eucarióticas possuem atividade através de dois homólogos a MutS que atuam como heterodímeros, a MutS α que é formado pelo complexo MSH2-MSH6 e o MutS β pelo complexo MSH2-MSH3. O complexo MSH2-MSH6 representa aproximadamente 80 a 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 de grandes inserções ou deleções. O MSH6 é uma subunidade responsável por reconhecer os erros de pareamento. O complexo MSH2-MSH3 é responsável pelo reconhecimento dos erros e correção de inserções e deleções de 2 a 9 bases na ausência de MSH6.

O passo seguinte nesse processo é desempenhado pela atividade da enzima ATPase, codificada NE metade carboxi-terminal dos homólogos mutS (FISHEL e WILSON 1997). O ganho de fosfato (ADP>ATP) no heterodímero hMutS α causa uma mudança conformacional no mesmo,

transformando-o em uma espécie de braçadeira que corre sobre a dupla fita de DNA a ser reparada (*sliding clamp*) desempenhando assim sua função (BLACKWELL et al. 1998; GRADIA et al. 1999; IACCARINO et al. 2000).

1.12 SEGUIMENTO DO PACIENTES DE RISCO

O seguimento de indivíduos com suspeita de SL em que o teste foi inconclusivo, ou de famílias em que o teste não pode ser realizado ou sem teste genético deve ser com base nas seguintes orientações (LYNCH e SMYRK 1996; LINDOR et al. 2006):

- Colonoscopia a cada 1 a 2 anos com início entre os 20 a 25 anos;
- US transvaginal a cada 1 a 2 com início com 25 a 35 anos para detecção de tumor de endométrio; além disto recomenda-se a biópsia aspirativa de endométrio;
- US de abdômen e pélvis a cada 1 a 2 anos iniciando aos 25 a 35 anos em paciente com antecedente de tumores de pelve renal e ureter e exame de urina I e citologia urinária;
- EDA a cada 1 a 3 anos com início aos 25 a 35 anos em famílias com antecedente de tumores gástricos;
- CA-125 anual com início aos 25 a 35 anos
- Exames preventivos para tumores de intestino delgado devem ser avaliado conforme o histórico familiar. A indicação de realização de exames deve ser considerado se houver sintomas como anemia ferropriva e dor abdominal. Os exames para prevenção seriam a

enteroscopia de duplo balão ou a cápsula endoscópica (TEN KATE et al. 2007).

- Pode-se propor a pacientes com risco elevado para tumores ginecológicos, em especial para mutação em gene MSH6 ou com forte histórico na família para tumores dessa localização a histerectomia total e salpingo-ooforectomia bilateral, como medida profilática para tumores de endométrio e ovários. Essa conduta deve ser cogitada durante o tratamento de tumor colorretal, em pacientes com prole constituída e em pacientes pós menopausadas (LINDOR et al. 2006). Esta conduta reduz sobremaneira o risco de tumores ginecológicos, em especial os de ovário em que rastreamento é mais difícil, no entanto existem descrição de 2 casos de tumor primário de peritônio após anexectomia bilateral profilática (SCHMELER et al 2010).

A realização de exames de prevenção e rastreamento de indivíduos sob risco de tumores na SL há redução de risco para morte relacionada ao câncer para todos os tumores, exceto para os de SNC (DE JONG et al. 2006b).

1.13 TRATAMENTO DE INDIVÍDUOS COM CÂNCER E SL

O tratamento de pacientes com CCR e SL apresenta alguns pontos divergentes em relação aos CCR esporádicos. Os pacientes com tumores de cólon com SL devem ser submetidos a colectomia total e

ileorretoanastomose, independente da localização do tumor no cólon. Esta conduta está indicada devido a elevada probabilidade de desenvolvimento de novas lesões intestinais metacrônicas no decorrer da sua vida. Mesmo assim estes indivíduos devem ser seguidos com retoscopia a cada 1 a 3 anos pelo risco de câncer do reto remanescente. Em pacientes com tumores de reto associado à SL devem ser submetidos a proctocolectomia total com preservação esfinteriana, utilizando a bolsa ileal em “J”, quando possível (tumores de reto médio e alto). Em tumores de reto distal a cirurgia indicada deve ser a proctocolectomia total com amputação do reto e ileostomia definitiva (SAKURAI e SILVA 2005).

Nos casos de tumores extracolônicos a cirurgia deve seguir os padrões de tratamento oncológico clássico para cada órgão acometido.

1.14 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

A definição molecular da SL é bem estabelecida (IONOV et al. 1993; HEMMINKI et al. 1994; PAPADOPOULOS et al. 1994; LIU et al. 1996), portanto, a identificação de portadores de alterações nos genes de reparo torna-se um ponto crítico para o manejo clínico dessas famílias (UMAR et al. 2004).

Embora existam alguns estudos isolados sobre a SL em pacientes sul-americanos (ROSSI et al. 2002; SARROCA et al. 2005; GIRALDO et al. 2005; BELLOLIO et al. 2006; VACCARO et al. 2007) a grande maioria das publicações avalia populações norte-americanas e européias. Como as

características da população brasileira são distintas, com grande diversidade de etnias e miscigenação atestam a importância da sua caracterização.

Outra questão refere-se às famílias que preenchem critérios clínicos para HNPCC e não apresentam defeitos no sistema de reparo (cerca de metade a 1/3 dos casos) (LYNCH e DE LA CHAPELLE 2003), classificadas como portadoras de síndrome X por LINDOR et al. (2005), cujo comportamento clínico ainda está para ser definido.

Não existem estudos com pacientes brasileiros com e suspeita de HNPCC, avaliando possíveis correlações de variáveis clínicas com os resultados de estudos moleculares de mutação em genes de reparo.

7

OBJETIVO

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo geral deste estudo é avaliar em pacientes com diagnóstico de HNPCC por critérios clínicos ou moleculares, a correlação de fatores clínicos, anatomopatológicos e dados familiares com as mutações em genes de reparo *MLH1*, *MSH2*, *PMS2* e *MSH6*.

2.2 OBJETIVOS SECUNDÁRIOS

Avaliar existência de fatores clínicos, anatomopatológicos ou de dados familiares que diferencie os portadores de mutação nos genes de reparo (*MLH1*, *MSH2*, *MSH2* e *PMS2*) e nos pacientes sem mutação em genes de reparo (Síndrome X).

Avaliar diferenças nas variáveis clínicas e anatomopatológicas nos probandos e familiares quanto a mutação específica em cada um dos genes *MLH1* ou *MSH2* isoladamente.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

Foram incluídos 43 pacientes considerados como probandos de famílias não relacionadas com diagnóstico clínico de HNPCC, que satisfaziam os critérios de Amsterdam I ou II, 37 pacientes (35 pacientes Amsterdam I e 2 pacientes Amsterdam II), e somado a 6 pacientes com suspeita clínica através dos critérios de Bethesda com confirmação do diagnóstico de SL através do diagnóstico molecular. Todos os pacientes probandos são pertencentes à casuística do Hospital A C Camargo com seguimento clínico e/ou tratamento realizado nesta instituição. Os pacientes foram selecionados inicialmente a partir de estudo mais amplo que incluía 90 pacientes estudados com seqüenciamento das proteínas de reparo (*MSH2*, *MLH1*, *MSH6* e *PMS2*) de famílias de alto risco para HNPCC. Foram excluídos os pacientes do grupo com critérios de Bethesda sem identificação de mutação nos genes de reparo. A distribuição conforme os critérios, dos 43 pacientes incluídos, estão na Tabela 2 e na Figura 1.

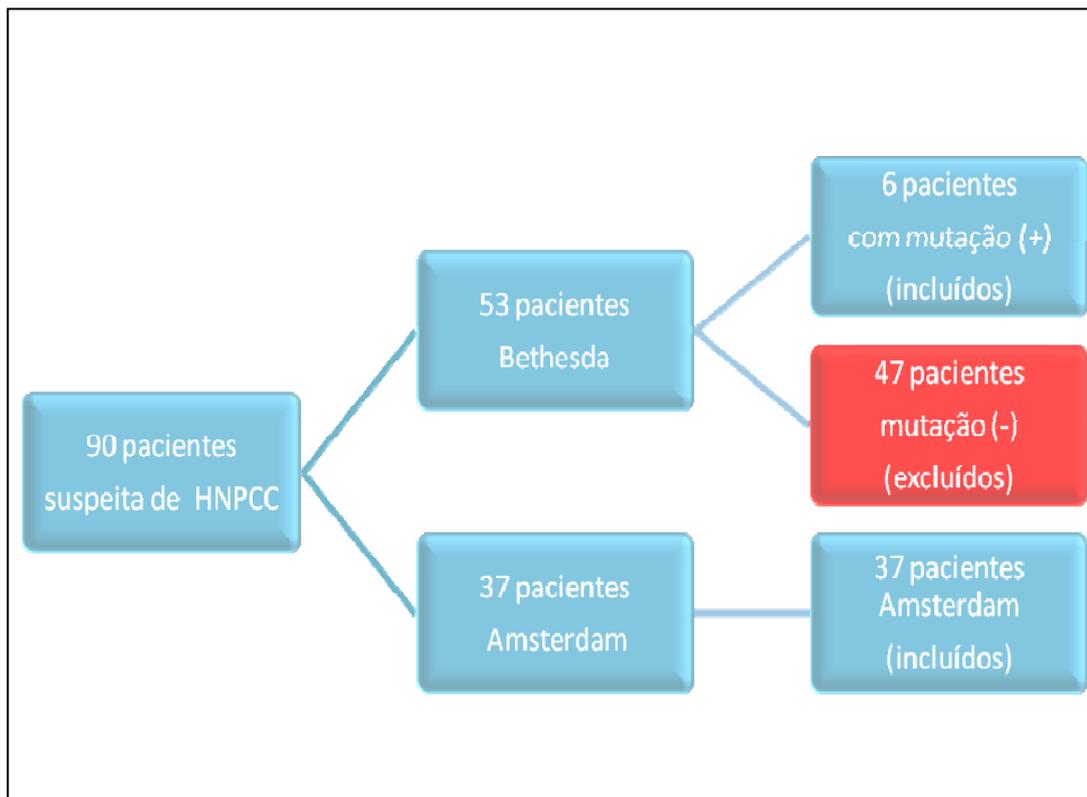


Figura 1 - Classificação das famílias incluídas no estudos conforme os critérios clínicos de Amsterdam e os de Bethesda somente com confirmação molecular de diagnóstico de SL por achado de mutação em genes de reparo.

Tabela 2 - Distribuição de acordo com os critérios clínicos das famílias.

Critério de classificação da família	n.	%
Amsterdam I	35	81,4
Amsterdam II	2	4,7
Bethesda	6	14,0
Total	43	100,0

3.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Os critérios para inclusão dos pacientes foram:

- Diagnóstico de câncer colorretal ou outros tumores relacionados à SL;
- Pertencer a famílias com suspeita clínica de SL, que preencham os critérios de Amsterdam
- Pertencer a famílias com suspeita de SL através dos critérios de Bethesda que tenham confirmação do diagnóstico através de diagnóstico molecular
- Disponibilidade e prévio consentimento para participação no estudo de pesquisa, referente à detecção de mutação em genes de reparo em material biológico, instabilidade de microssatélites e estudo de imunistoquímica nos tumores;
- Acompanhamento, ou registro da família no Hospital A.C. Camargo e registro no Registro de Câncer Colorretal Hereditário.

3.2 REGISTRO E CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO

O Registro de Câncer Colorretal Hereditário (RCCH) iniciou suas atividades em 1992 e contava em 2005 com 243 famílias registradas, na época do início do recrutamento de pacientes. A missão do RCCH do Hospital do Câncer é contribuir para a redução da morbidade e mortalidade do câncer, através da educação de famílias sobre os riscos e implicações do câncer colorretal hereditário e dos tumores associados; coordenar as

atividades de seguimento dessa população e gerar subsídios para pesquisas que possam contribuir com o melhor entendimento sobre a hereditariedade associada ao câncer. Os objetivos do registro são: identificar, através da história familiar, indivíduos de alto risco para o desenvolvimento de câncer colorretal e de tumores associados; estabelecer estratégias de seguimento e diagnóstico precoce; educar profissionais e famílias sobre o câncer colorretal hereditário; realizar pesquisas sobre o câncer colorretal hereditário. A Tabela 3 demonstra o número de famílias registradas no RCCH até dezembro de 2005, época que se deu início o recrutamento dos pacientes.

Tabela 3 - Distribuição das famílias registradas no RCCH (até dezembro de 2005).

CLASSIFICAÇÃO	N	%
FAP (Polipose Adenomatosa Familiar)	13	5,4
Outras poliposes	8	3,3
HNPCC (Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose)	37	15,2
CCB (Critério de Bethesda)	99	40,7
CCF (Câncer colorretal familiar)	35	14,4
AFC (Agregação familiar de câncer)	51	21,0
Total	243	100

3.3 PROCEDIMENTOS

Os pacientes selecionados na fase de recrutamento receberam uma carta-convite, relacionado à parte de coleta de material biológico e seu estudo. Os pacientes tiveram os dados clínicos relativos aos pacientes probandos, ao respectivo tumor de cólon ou reto, ou outro tumor primário, seus antecedentes hereditários coletados a partir de informações contidas

no prontuário médico e em informações armazenadas no banco de dados do Registro de Câncer Colorretal Hereditário (RCCH), em ficha de coleta de dados elaborada para o estudo (Anexo). Os dados sobre a história familiar foram coletados em ficha própria, elaborada para o estudo (Anexo 1).

3.4 DADOS MOLECULARES

O estudo molecular fez parte de outro projeto de pesquisa mais amplo envolvendo o trabalho de três outros pesquisadores, realizado no Laboratório de Pesquisa do Hospital A.C. Camargo, envolvendo a mesma casuística.

3.4.1 Seqüenciamento dos genes de reparo

Esta fase do estudo foi realizada por dois outros investigadores, incluindo a coleta de material biológico e o seu processamento, dentro do laboratório de pesquisa do Hospital A.C. Camargo. Os dados moleculares obtidos foram utilizados para correlação: mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* (seqüenciamento direto) em tecido normal. Nos pacientes com resultados negativos para os genes *MLH1* e *MSH2* foram testados para os genes *MSH6* e *PMS2*, nesta ordem.

O material biológico utilizado foi o sangue periférico obtido por coleta direta após concessão do paciente e armazenado em tubo com EDTA, encaminhado para o laboratório para purificação de ácidos nucléicos onde foram mantidos a 4°C até o momento da purificação do DNA. Realizado a

separação dos leucócitos da amostra por meio do Tris-EDTA-TE pH 8,0 até a obtenção de um *buffy coat* ou *pellet*. O *pellet* foi armazenado a - 80°C até o momento da extração do DNA. O DNA genômico foi extraído utilizando o *Puregene Blood Kit DNA Isolation* conforme a especificações da empresa à partir do *buffy coat* armazenado. O DNA foi quantificado através *NanoDrop* ND-1000 e avaliado quanto a sua pureza através da determinação de OD 260 e 280. A avaliação da integridade do DNA foi realizada em gel de agarose à 0,8% em uma corrida durante 60 minutos na voltagem de 100mV, sendo que a sua qualidade foi atestada conforme os parâmetros utilizados na instituição.

Os iniciadores para os genes estudados foram desenhados a partir do banco *NCBIINucleotide* (NM_000249.2, NM_000251.1, NM_000179.2 e NM_000535) para o *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* respectivamente. As sequências acima foram utilizadas como base para desenho dos iniciadores nas regiões intrônicas a cerca de 70b do limite exon-intron para cada um dos exons de cada gene estudado (tanto para *Forward* quanto para o *Reverse*).

Os iniciadores produzidos foram utilizados para as reações de PCR. A reação de PCR foi realizada no *PCR Master Mix* (Promega, USA) para reação de seqüenciamento direto no aparelho ABI 3130 (*Applied Biosystems*, SP, Brasil). Foi realizado inicialmente a análise de uma amostra referência obtida de um indivíduo normal sem histórico de câncer, para servir de padrão normal e comparar com as amostras dos pacientes estudados. O seqüenciamento das amostras de cada um dos pacientes foram analisadas em equipamento *ABIPrismi* 3130 (*Applied Biosystems*, SP, Brasil). Os

resultados obtidos foram confirmados através da repetição do seqüenciamento em uma segunda amostra separada.

Para a interpretação e determinação da significância patogênica das mutações encontradas foram consultados as bases de dados existentes:

- InSIGHT- *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors* (<http://www.insight-group.org/>)
- MMR Gene Unclassified Variants Database (<http://www.mmrurv.inf>)
- Mismatch Repair Genes variants 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>)

As mutações não descritas previamente foram determinadas como patogênicas ou não conforme o tipo de mutação encontrada correlacionando com as definições nas bases de dados existentes. As mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* foram interpretadas como patogênicas uma vez que ocasionam interrupção precoce da proteína no primeiro (determinação de *stop codon*) ou a mudança na fase de leitura dos códons distais à alteração ocorrida, no segundo caso, causando mudança dos aminoácidos na tradução do RNA mensageiro, e determinando geralmente um *stop codon* adiante com interrupção prematura da tradução da proteína (proteína truncada). Ambas causam grande mudança conseqüente na sua estrutura com implicações na função. As mutações que afetam os sítios doadores ou receptores de *splicing*, também foram consideradas como patogênicas uma

vez que afetam o processo de *splicing* do RNAm, afetando a estrutura da proteína de forma mais grave.

As mutações do tipo *missense* em que ocorre modificação de um único nucleotídeo e conseqüente troca de um aminoácido por outro, sem alteração da extensão da proteína, e poucas alterações na estrutura. Nestes a definição de patogenicidade não é tão simples. As formas de definição da patogenicidade está da avaliação da segregação da mutação encontrada dentro da família entre os indivíduos com tumor característico da síndrome, relacionando o gene mutado com familiares com a doença e o não mutado com indivíduos sem a doença. Outro método para esta avaliação é através dos testes de funcionalidade da proteína de reparo realizada *in vitro*, utilizando fungos ou vírus (SHIMODAIRA et al. 1998; CLARK et al. 1999; DROTSCHMANN et al. 1999; JICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). Uma terceira forma de identificação de presunção de patogenicidade é a aplicação da proteína mutada em modelos de predição de patogenicidade.

Para as mutações do tipo missense, não descritos previamente nas bases de dados e na literatura, foram utilizados dois algoritmos complementares para a predição de sua patogenicidade, neste estudo. Foram utilizados os algoritmos:

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

Os valores de Polyphen são de 0 a 3.37, os escores >2.0 foram considerados como “possivelmente prejudiciais”, enquanto que valores de escores de 1.50 a 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.

Os valores do SIFT são de 0 a 1 e escores ≤ 0.05 foram consideradas como “tolerante”, conforme as recomendações do programa.

3.4.2 Imunoistoquímica para as proteínas de reparo

A imunoistoquímica para as proteínas MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2 foi realizado em cortes parafinados tecido tumoral do probando utilizando-se os seguintes anticorpos:

- MLH1- clone 168-728-BD PharMingen – diluição 1/600;
- MSH2- clone FE11-BD Carbiochem- diluição 1/1000;
- MSH6 – clone 44-BD Pharmingen- diluição 1/40;
- PMS2 – clone A16-4-BD Pharmingen – diluição 1/500

O material parafinado foi submetido a desparafinização, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, bloqueio de proteínas endógenas, bloqueio de proteínas inespecíficas, incubação com anticorpo primário, amplificação (sistema polímero), coloração (DAB), montagem das lâminas e leitura.

3.4.3 Instabilidade de microssatélites

Instabilidade de microssatélites foi analisada através de uma painel de 10 marcadores incluindo quatro mononucleotídicos (BAT-25, BAT-26, BAT34c4 e BAT40) e cinco dinucleotídicos (D10S197, D17S250, D18S55, D5S246 e ACTC) e um de composição variável, sendo mononucleotídico

flanqueado por repetições tetra ou pentanucleotídicas (MYCL), através de uma reação de PCR fluorescente. Os oligonucleotídios dos marcadores foram confeccionados pela empresa ABI. A instabilidade de microssatélite foi pesquisado em material tumoral parafinado. A reação de PCR foi obtida e submetida a análise no equipamento ABI PRISM3130 *Automated Genetic Analyser*. A análise foi realizada comparando com tecido normal do paciente. A classificação foi realizada de acordo com a frequência de instabilidade dos marcadores, sendo considerada alta quando mais de 30% dos marcadores forem instáveis (MSI-H), baixa quando menos de 30% forem instáveis, conforme a sugestão do NCI. Em função das dificuldades técnicas de utilização de material parafinado do arquivo do hospital que se encontrava degradado, os estudos de instabilidade prosseguiram sendo realizados somente em material obtido de Banco de Tumores com material tumoral congelado, em pacientes que dispunham desse material no momento do estudo.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados referentes a cada um dos pacientes coletados em formulário elaborado foram transferidas em arquivo de banco de dados do programa SPSS *Statistics* versão 17.0. Para avaliar a associação das variáveis independentes com o achado de mutação em qualquer dos genes de reparo identificado foi utilizado o teste qui-quadrado ou exato de Fisher (quando a frequência observada for inferior a 5). Diferenças $p \leq 0,05$ foram

consideradas estatisticamente significantes. O mesmo processo foi utilizado para avaliação de correlação dos fatores clínicos, anatomopatológicos e de dados familiares com a mutação de *MSH2* assim como para a mutação de *MLH1* isoladamente.

Para a obtenção de curva de sobrevida dos pacientes probandos foi utilizado o método de KAPLAN e MEIER (1958).

3.6 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi conduzido de acordo com a Resolução 196/96 que regulamenta a pesquisa em seres humanos; e a resolução 340/04 que regulamenta a pesquisa em genética humana. O projeto de pesquisa foi aprovado em Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo com a identificação 796/06 e 831/06.

Todos os sujeitos de pesquisa assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido antes de participar do estudo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA

4.1.1 Pacientes probandos

Foram analisados 43 pacientes não relacionados que preencheram os critérios de inclusão.

A casuística considerando os probandos das famílias incluídos no estudo estão representada na Tabela 4.

Tabela 4 - Variável demográfica dos probandos conforme o gênero.

Variável	categoria	freqüência
Gênero	Masculino	18 (41,9%)
	Feminino	25 (58,1%)

Foram avaliados as características clínicas e anatomopatológicas do CCR encontrado em 43 probandos, considerando o primeiro tumor em pacientes que apresentaram outros tumores metacrônicos, e no caso de CCR sincrônicos consideramos o tumor mais avançado. Em 3 pacientes probandos não apresentavam tumor colorretal e não foram incluídos nesta tabela (foram incluídos no estudo por apresentarem outros tumores – diferente de CCR relacionado a SL). A idade ao diagnóstico foi categorizada com corte em 50 anos em razão dos critérios de Amsterdam que tem esse como limite de idade. A divisão dos tumores colônico conforme a sua

localização, proximal ou distal, foi categorizada tendo como limite o ângulo esplênico, incluindo os tumores proximais a essa localização como de cólon proximal e os distais (descendente, sigmóide e reto) como distais. O item cólon como primeiro tumor foi definido como sendo quando o CCR foi considerado o primeiro tumor na cronologia de aparecimento e diagnóstico, em casos em que havia no mesmo probando um ou mais tumores extracolônicos além do CCR. Os dados anatomopatológicos do CCR, incluindo os de estadiamento TNM, grau, e os demais itens foram obtidos a partir do exame anatomopatológico quando o paciente havia sido tratado cirurgicamente no Hospital A.C. Camargo. No caso de pacientes tratados em outros serviços foram considerados os laudos dos hospitais de origem e/ou uma revisão no Hospital A.C. Camargo. A histologia SL se refere a qualquer dos itens que são sugestivas de SL em que foram incluídas as características: *Chron's like*, cribiforme e aspecto mucinoso quando presente qualquer uma delas isolada ou em associação foi considerado como positivo. As variáveis clínicas e anatomopatológica dos CCR dos probandos e suas frequência estão apresentadas na Tabela 5.

Tabela 5 - Variáveis clínicas e anatomopatológicas do CCR dos probandos.

Variável	categoria	freqüência
CCR	Sim	40 (93,0%)
	Não	3 (7,0%)
CCR	Único	29 (67,4%)
	Múltiplo	11 (25,6%)
	s/ CCR	3 (7,0%)
Idade de diagnóstico de CCR	Mediana	43 anos
	Média	44,3 anos
Idade de diagnóstico CCR	≤ 50 anos	27 (67,5%)
	> 50 anos	13 (32,5%)
Localização do CCR	Proximal	18 (45,0%)
	Distal	15 (37,5%)
	Sincrônico	7 (17,5%)
Cólon como primeiro tumor (em tumores múltiplos)	Sim	13 (76,5%)
	Não	4 (23,5%)
Estadiamento T	T1-T2	14 (40,0%)
	T3-T4	21 (60,0%)
Estadiamento N	N0	30 (81,1%)
	N(+)	7 (18,9%)
Estadiamento M	M0	38 (95,0%)
	M(+)	2 (5,0%)
Grau de diferenciação CCR	Baixo grau	9 (29,0%)
	Alto grau	22 (71,0%)
Infiltrado linfocitário	Sim	17 (42,5%)
	Não	23 (57,5%)
Invasão sanguínea	Sim	4 (10,0%)
	Não	36 (90,0%)
Invasão linfática	Sim	5 (12,5%)
	Não	35 (87,5%)
Invasão perineural	Sim	4 (10,0%)
	Não	36 (90,0%)
Componente mucinoso	Sim	11 (29,7%)
	Não	26 (70,3%)
Tumor cribiforme	Sim	2 (5,0%)
	Não	38 (95,0%)
"Chron like"	Sim	1 (2,5%)
	Não	39 (97,5%)
Reação desmoplásica	Sim	7 (17,5%)
	Não	33 (82,5%)
Histologia SL	Sim	14 (35,0%)
	Não	26 (65,0%)

Quanto ao item adenoma colorretal foi considerado o histórico de exame de colonoscopia realizado pelo probando com achado de adenoma nos exames assim como na peça operatória de ressecção de segmentos intestinais (para tratamento do CCR). A idade de diagnóstico considerada em relação ao adenoma foi a idade do primeiro adenoma no probando. A idade de corte para o diagnóstico de primeiro adenoma foi de 40 anos em decorrência dos critérios de Bethesda que define esta como idade limite. Estes dados estão representados na Tabela 6.

Tabela 6 - Variáveis relativas aos adenomas nos probandos.

Variável	categoria	Frequência
Adenoma	Sim	27 (62,8%)
	Não	16 (37,2%)
Idade de diagnóstico de adenoma colorretal	Mediana	48,0 anos
	Média	50,3 anos
Idade de diagnóstico de adenoma	<40	4 (14,8%)
	>40	23 (85,2%)

Quanto aos tumores extracolônicos diagnosticados nos probandos, foi considerado inicialmente todos os tumores relacionados com a SL. Na maioria das vezes os probandos apresentaram como primeiro tumor o CCR e posteriormente desenvolviam um segundo e eventualmente um 3º e 4º tumor primário. Um dos pacientes probandos apresentou até um 4º tumor primário, todos independentes. O item tumor extracolônico SL se refere a presença de qualquer dos tumores extracolônicos, relacionado com a SL. O item número de tumores malignos considerou a quantidade de tumores malignos (primários) diferentes e independentes que o paciente tenha

apresentado, incluindo os de cólon múltiplos e os outros tumores extracolônicos, mesmo que não estejam relacionados à SL. Este item foi categorizado em até 1 tumor primário e mais de 1 (2 ou mais). Nos pacientes com vários tumores de cólon em que o número não tenha sido registrado foi considerado como tendo 2 primários de cólon. As variáveis consideradas em relação às famílias e sua frequência estão representadas na Tabela 7.

Tabela 7 - Tumores extracolônicos relacionados aos probandos.

Variável	categoria	Frequência
Tumor de endométrio	Sim	6 (14,0%)
	Não	37 (86,0%)
Tumor de estômago	Sim	2 (4,7%)
	Não	41 (95,3%)
Tumor de intestino delgado	Sim	1 (2,3%)
	Não	42 (97,7%)
Pelve renal ou ureter	Sim	1 (2,3%)
	Não	42 (97,7%)
Tumor de ovário	Sim	0 (0%)
	Não	43 (100%)
Tumor de pâncreas	Sim	1 (2,3%)
	Não	43 (97,7%)
Tumor de SNC	Sim	0 (0%)
	Não	43 (100%)
Tumor sebáceo	Sim	0 (0%)
	Não	43 (100%)
Tumor de mama	Sim	4 (9,3%)
	Não	39 (90,7%)
Tumor de tireóide	Sim	0 (0%)
	Não	43 (100%)
Tumor extracolônico SL	Sim	10 (23,3%)
	Não	33 (76,7%)
Número de tumores malignos	1	23 (54,8%)
	>1	19 (45,2%)

Na Tabela 8 está demonstrada o número de tumores por paciente entre os probandos, com variação 0 a 4 tumores primários independentes por paciente, incluindo neste os tumores colorretais e os extracolônicos. Um paciente foi incluído no estudo mesmo não apresentando tumor de cólon ou tumor extracolônico por apresentar adenoma de alto grau entre outros adenomas em cólon e por pertencer a família Amsterdam I. Os adenomas de alto grau foi considerado como adenoma e não como adenocarcinoma, exceto quando havia infiltração do cólon. Foram diagnosticados pelo menos 69 tumores distintos em 43 pacientes probandos.

Tabela 8 - Número de tumores malignos encontrado em pacientes probandos, incluindo os CCR e os tumores extracolônicos.

Número de tumores malignos no probando (incluindo CCR e extracolônicos)	n.	%
sem tumor maligno	1	2,3
1	23	53,5
2	12	27,9
3	6	14,0
4	1	2,3
Total	43	100,0

Foi considerado para inclusão na Figura 2, a idade dos pacientes probandos com CCR e somente para o primeiro tumor diagnosticado. A distribuição foi realizada dividindo por décadas iniciando na faixa dos 10 a 20 anos até 71 a 80 anos. O maior contingente de pacientes encontrava-se abaixo dos 50 anos (67,5%).

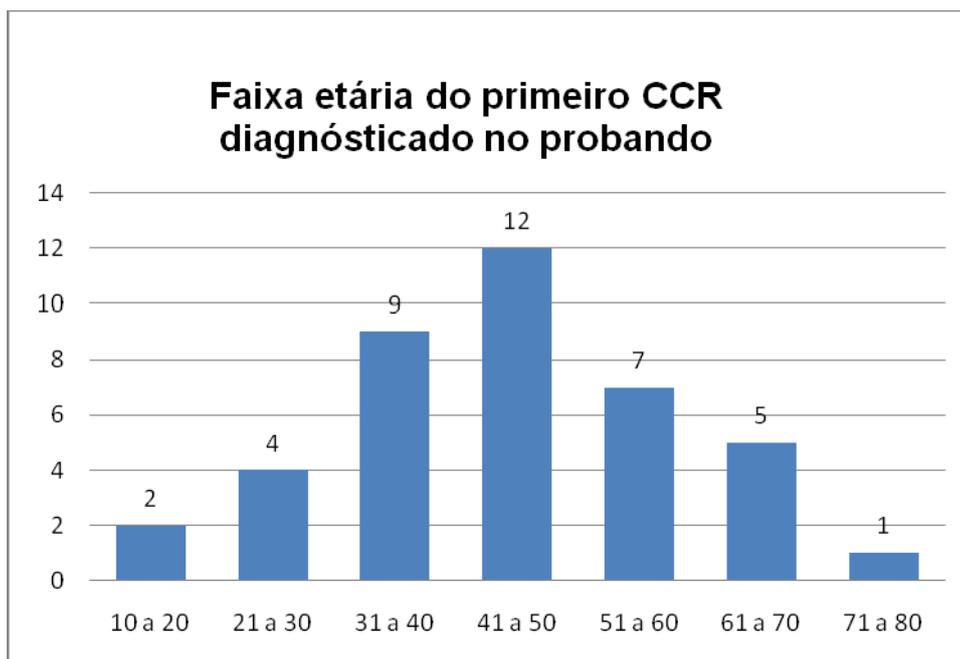


Figura 2 - Distribuição de acordo com a faixa etária do primeiro CCR diagnosticado no probando.

A Figura 3 mostra a distribuição dos CCR dos probandos quanto a tumores múltiplos, sincrônicos ou metacrônicos, únicos e os pacientes sem CCR. A maioria dos pacientes apresentavam tumores (CCR) únicos, porém o índice de tumores múltiplos na casuística está acima do esperado quando se compara com tumores esporádicos.

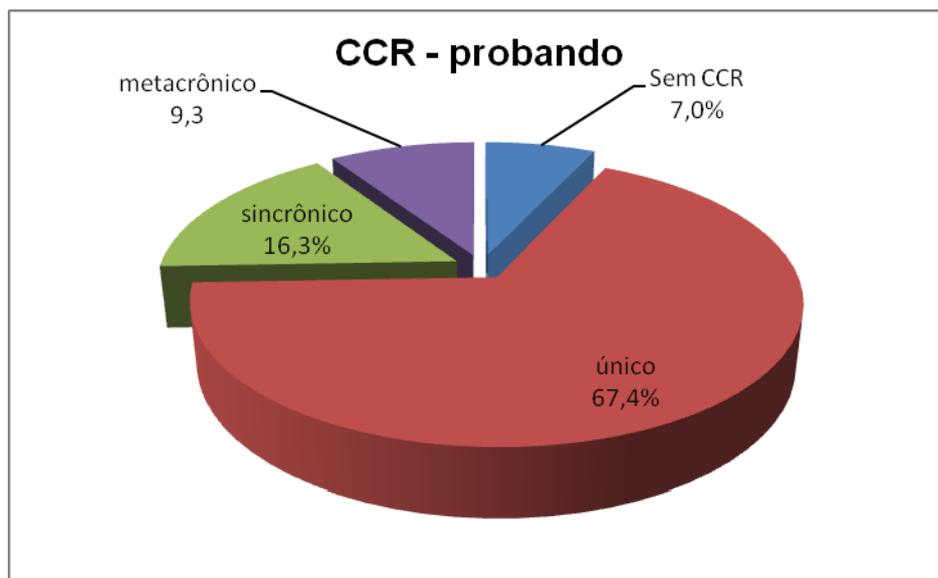


Figura 3 - Gráfico mostrando a distribuição dos CCR de acordo com o número de CCR, se sincrônico, metacrônico, único ou sem tumor de cólon ou reto no probando.

A Tabela 9 mostra a distribuição conforme o estado do probando em relação ao CCR na sua última consulta médica. A maioria dos pacientes permanece vivo sem evidência de doença. Três pacientes permanecem vivos, porém com tumor em atividade, sendo um com tumor de mama avançado com doença metastática, um paciente com tumor de pulmão avançado e um paciente com tumor de reto recidivado, localmente avançado. Dois pacientes encontram-se perdidos de vista. A sobrevida global é de 95,4% com com média de seguimento de 116,5 meses e com variação de seguimento de 20,5 a 305,8 meses. A Figura 4 mostra a curva de sobrevida atuarial de Kaplan-Meier. Não foi possível uma análise em função da sobrevida devido a baixa incidência de óbitos no grupo.

Tabela 9 - Estado dos probandos em relação ao CCR na última avaliação de seguimento.

Probandos em relação ao câncer	n.	%
Vivo sem evidência de doença	38	88,4
Vivo com doença em atividade	3	7,0
Perdido de vista	2	4,7
Total	43	100,0

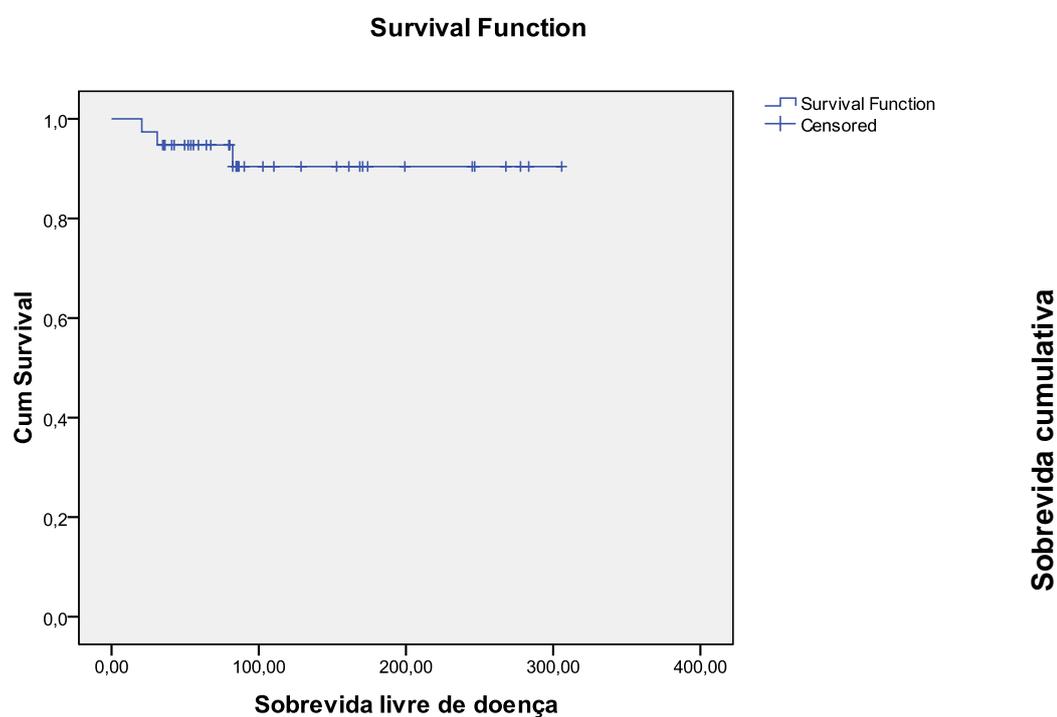


Figura 4 - Sobrevida atuarial livre de doença dos pacientes probandos tratados de CCR

A Tabela 10 ilustra a sobrevida global dos pacientes probandos e a Tabela 11 mostra a sobrevida específica dos pacientes probandos com CCR classificandos em tempo de sobrevida divididos em menos ou mais de 5 anos de sobrevida.

Tabela 10 - Sobrevida global dos pacientes probandos tratados de CCR.

Sobrevida global	tempo (meses)
média de sobrevida global	109,9
mediana de sobrevida global	84,9
Variação	29,5 a 305,7

Tabela 11 - Sobrevida específica para o CCR em probandos.

Sobrevida específica para CCR	n.	%
<5 anos	11	31,4
>5 anos	24	68,6
Total	35	100,0

A Tabela 12 mostra o número de adenoma encontrado por probandos, variando de 0 a 4 pólipos diagnosticados.

Tabela 12 - Número de adenoma por probando.

Número de adenoma probandos	n.	%
0	16	37,2
1	16	37,2
2	7	16,3
3	3	7,0
4	1	2,3
Total	43	100,0

Na Figura 5 encontra-se a distribuição dos tumores extracolônicos encontrado nos probandos, segundo a localização e a frequência.

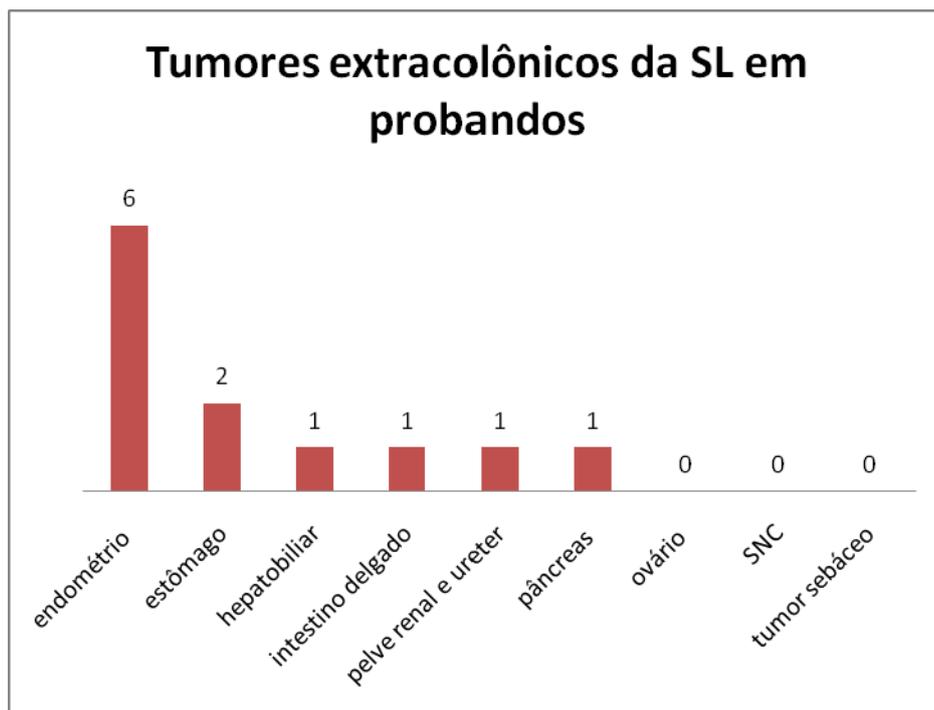


Figura 5 - Frequência de tumores extracolônicos, relacionado com a SL, encontrados nos probandos.

A distribuição de todos os tumores, exceto os colorretais, presente nos probandos encontra-se demonstrado na Tabela 13, incluindo os tumores que não fazem parte da SL:

Tabela 13 - Tumores extracolônicos encontrados nos probandos, todos mesmos os não pertencente à SL, excluído os tumores colorretais

Tumor extracolônico (todos)	n.	%
Endométrio	6	33,3
Mama	4	22,2
Estômago	2	11,1
hepatobiliar	1	5,6
intestino delgado	1	5,6
pelve renal e ureter	1	5,6
Pâncreas	1	5,6
Pumão	1	5,6
sarcoma de partes moles	1	5,6
Ovário	0	0,0
SNC	0	0,0
tumor sebáceo	0	0,0
Total	18	100,0

Na Figura 6 estão representados todos os tumores extracolônicos mesmos os não relacionados à SL.

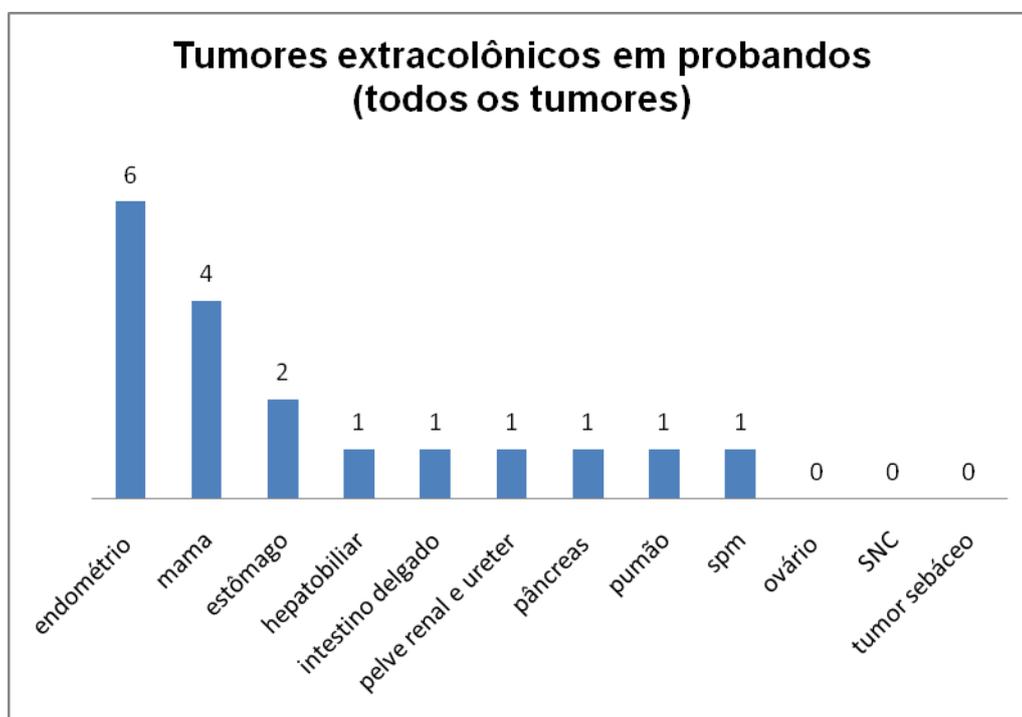


Figura 6 - Todos os tumores extracolônicos descritos nos probandos.

4.1.2 Famílias

O número de indivíduos incluídos no heredograma de cada família e que fez parte do estudo variou de 3 a 99 indivíduos por família com uma mediana de 28 indivíduos por família distribuídos em 2 a 5 gerações. A maioria das famílias, as informações obtidas, foi de mais de 4 gerações (83,8%). Foram obtidas informações de 1305 indivíduos entre probandos e familiares sendo 687 do sexo masculino e 618 do feminino. A Tabela 14 mostra o número de gerações por família estudada.

Tabela 14 - Número de gerações estudadas nas famílias.

número de gerações estudadas	n.	%
2	2	4,7
3	6	14,0
4	25	58,1
5	10	23,3
Total	43	100,0

As variáveis levantadas a partir dos dados obtidos das famílias estão representados na Tabela 15, incluindo dados em relação aos CCR, adenomas colorretais, tumores extracolônicos relacionados à SL, o número de tumores por família relacionado à SL, outros tumores extracolônicos na família, a densidade tumoral na família (relação familiar com tumor com total de familiares na família) e número total de tumores na família.

Tabela 15 - Variáveis referentes aos familiares em famílias com suspeita de SL.

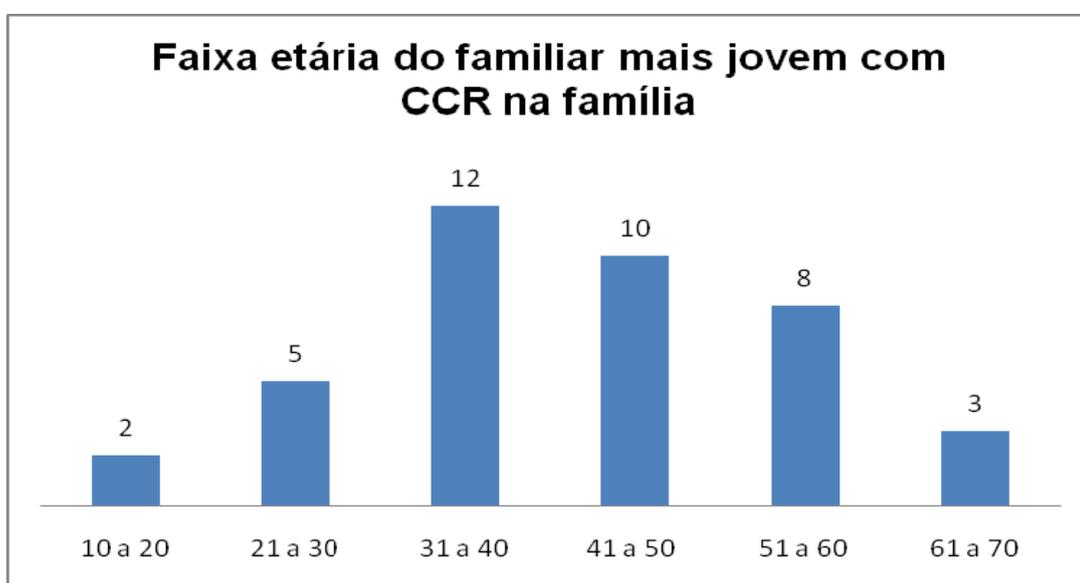
Variáveis relacionados às famílias	Categoria	freqüência
Número de casos de CCR	até 4	32 (72,4%)
	>5	11 (25,6%)
Indivíduos com adenoma na família	Sim	24 (55,8%)
	Não	19 (44,2%)
Tumor de endométrio na família	Sim	13 (30,2%)
	Não	30 (69,8%)
Tumor de estômago na família	Sim	15 (34,9%)
	Não	28 (65,1%)
Tumor de hepatobiliar na família	Sim	2 (4,7%)
	Não	41 (95,3%)
Tumor de delgado na família	Sim	2 (4,7%)
	Não	41 (95,3%)
Tumor de pelve renal e ureter na família	Sim	2 (4,7%)
	Não	41 (95,3%)
Tumor de ovário na família	Sim	3 (7,0%)
	Não	40 (93,0%)
Tumor de pâncreas na família	Sim	3 (7,0%)
	Não	40 (93,0%)
Tumor de SNC na família	Sim	6 (14,0%)
	Não	37 (86,0%)
Tumor sebáceo na família	Sim	2 (4,7%)
	Não	41 (95,3%)
Tumor extracolônico SL na família	Sim	32 (74,4%)
	Não	11 (25,6%)
Número de tumor SL na família	até 3	12 (27,9%)
	> 4	31 (72,1%)
Tumor de mama na família	Sim	11 (25,6%)
	Não	32 (74,4%)
Relação familiar com tumor/total	<0,25	26 (60,5%)
	>0,25	17 (39,5%)
Número de familiares com tumor (todos os tumores)	Até 5	24 (55,8%)
	>6	19 (44,2%)

A Tabela 16 expõe o número de tumores colorretais encontrado por família variando de 0 a 11 indivíduos com tumor colorretal dentro da família.

Tabela 16 - Número de CCR encontrado nas famílias.

Número de indivíduos com CCR na família	n.	%
0	1	2,3
1	1	2,3
2	16	37,2
3	5	11,6
4	9	20,9
5	3	7,0
6	2	4,7
8	3	7,0
9	1	2,3
10	1	2,3
11	1	2,3
Total	43	100,0

A Figura 7 mostra o gráfico com a representação da distribuição conforme a faixa etária com intervalos de 10 anos.

**Figura 7** - Faixa etária do paciente mais jovem com CCR na família.

A Figura 8 com o gráfico mostra a frequência de tumores encontrado nas famílias consideradas conforme o sítio primário de tumores, incluindo somente os tumores extracolônicos relacionados à SL.

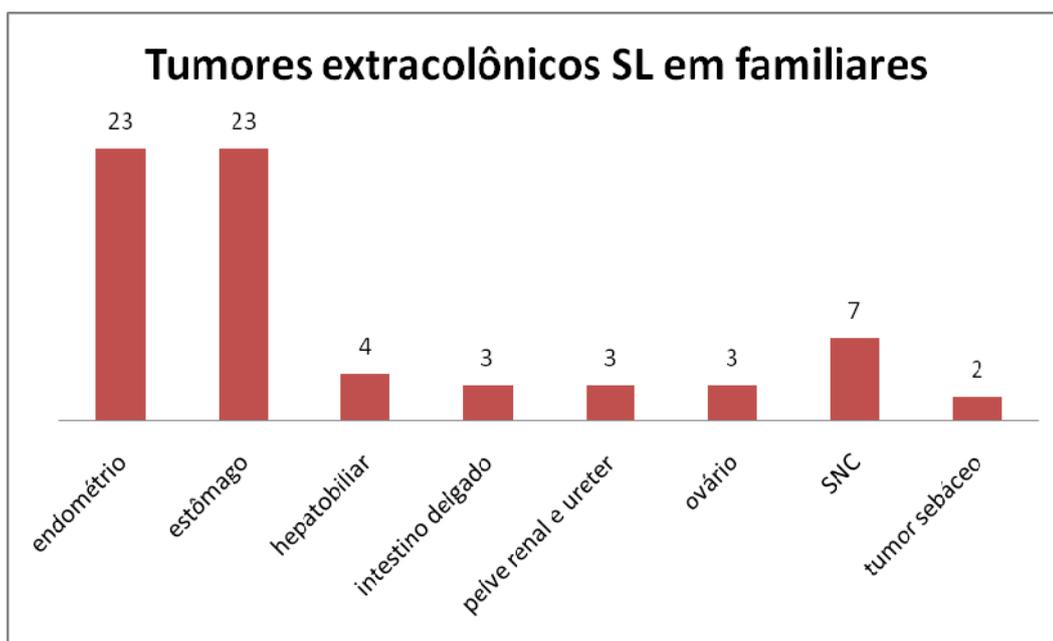


Figura 8 - Frequência de tumores extracolônicos relacionados à SL encontrados nos familiares.

Na Tabela 17 mostra o número total de tumores por família, tendo sido incluído todos os tumores extracolônicos relacionados à SL e o CCR. Foi verificado um total de 244 tumores relacionados a SL.

Tabela 17 - Número de tumores extracolônicos relacionados à SL e CCR nas famílias.

Número de tumores extracolônicos SL e CCR nas famílias	n.	%	total de tumores
2	5	11,6	10
3	7	16,3	21
4	7	16,3	28
5	9	20,9	45
6	6	14,0	36
7	1	2,3	7
9	1	2,3	9
11	2	4,7	22
12	2	4,7	24
13	1	2,3	13
14	1	2,3	14
15	1	2,3	15
Total	43	100,0	244

A Tabela 18 ilustra a distribuição de tumores de mama encontrado nas famílias, com o número de indivíduos por família acometido por este tumor.

Tabela 18 - Número de tumores de mama encontrado por família.

Número de tumores de mama por família	n.	%	total de tumor de mama
1	6	14,0	6
2	4	9,3	8
4	1	2,3	4
total	11	25,6	18
famílias sem tumor de mama	32	74,4	
total geral	43	100,0	

A Tabela 19 mostra todos os tumores encontrados nas famílias, sua frequência em toda a casuística.

Tabela 19 - Todos os tumores encontrado nas famílias.

Tumores extracolônicos (todos) e CCR familiares	n.	%
CCR	165	61,1
Endométrio	23	8,5
Estômago	23	8,5
Mama	18	6,7
SNC	7	2,6
tumor hematológico	5	1,9
Hepatobiliar	4	1,5
tumor de próstata	4	1,5
intestino delgado	3	1,1
pelve renal e ureter	3	1,1
Ovário	3	1,1
Tireóide	3	1,1
tumor de CP	3	1,1
tumor de pulmão	3	1,1
tumor sebáceo	2	0,7
Neuroblastoma	1	0,4
Total	270	100,0

Na Tabela 20 está representado a distribuição dos valores da densidade de tumor na família (relação entre o número de indivíduos com tumor por família com o número total de indivíduo na família) que varia de 0 a 1 sendo distribuído em faixas com intervalos de 0,1.

Tabela 20 - Relação número de familiares com tumor x total de familiares – Densidade de tumores na família.

Relação total de tumor x total de familiares	n.	%
0 a 0,10	6	14,0
0,11 a 0,20	11	25,6
0,21 a 0,30	11	25,6
0,31 a 0,40	8	18,6
0,41 a 0,50	3	7,0
0,51 a 0,60	1	2,3
0,61 a 0,70	2	4,7
0,71 a 0,80	1	2,3
0,81 a 0,90	0	0,0
0,91 a 1,00	0	0,0
Total	43	100,0

Na Figura 9 está a representação gráfica do número total de tumores por família, variando de 2 a 16 tumores em uma família. A média de tumores por família é de 6,6 e a mediana de 5 tumores por família.

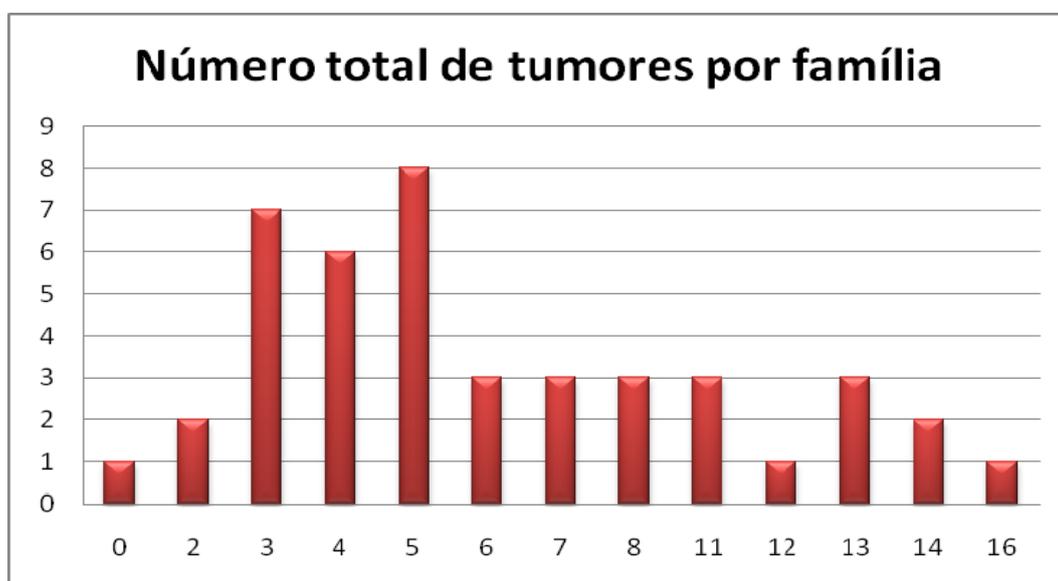


Figura 9 - Número total de tumores por família.

O estudo das proteínas de reparo através da imunohistoquímica em tecido tumoral foi realizada em 28/43 pacientes probandos e a instabilidade de microssatélites realizado em 10/43 pacientes probandos. Estes estudos foram realizados nos pacientes que possuíam material tumoral parafinado arquivado de boa qualidade para o estudo de imunohistoquímica e a disponibilidade de material tumoral a fresco para a avaliação de instabilidade de microssatélites.

Foram estudadas as proteínas de reparo MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. A frequência dos achados está contida na Tabela 21. A ocorrência de ausência de alguma das 4 proteínas estudadas com a imunohistoquímica (em pelo menos 1 delas) ocorreu em 17/28 (58,6%).

4.2 RESULTADOS MOLECULARES

4.2.1 Imunohistoquímica

Tabela 21 - Frequência de alterações em proteínas de reparo estudadas em tumores dos probandos.

proteína de reparo	expressão IHQ	n.	%
MLH1	ausência	4	14,3
	presença	24	85,7
MSH2	ausência	11	39,3
	presença	17	60,7
MSH6	ausência	11	39,3
	presença	17	60,7
PMS2	ausência	8	28,6
	presença	20	71,4

A combinação de ausência de expressão de 2 proteínas de reparo foi observada conforme a Tabela 22. Em 9 pacientes estudados as proteínas de reparo se mostraram com expressão normal, ou seja com positividade para todas elas. Observamos dessa forma ausência de alguma proteína de reparo em 19/28 pacientes estudado (67,9%).

Tabela 22 - Combinações encontradas no estudo por IHQ para as proteínas de reparo nos tumores dos probandos.

Agrupamento	n.	%
positivos	9	32,1
MLH1/PMS2 negativos	4	14,3
MSH2/MSH6 negativos	11	39,3
Somente PMS2 negativos	4	14,3
Total	28	100,0

4.2.2 Instabilidade de microssatélites

A instabilidade de microssatélites foi realizada em 10/43 probandos. Os achados estão representados na Tabela 23 e na Figura 13 sendo que agrupamento foi considerado MSS (estável) os estáveis e os MSI-L conjuntamente:

Tabela 23 - Frequência de resultados em pesquisa de microssatélites em tumores de probandos com suspeita de SL.

MSI	n.	%
MSS	3	30,0
MSI-High	7	70,0
Total	10	100,0

O estudo de mutações por seqüenciamento nos genes de reparo *MSH2*, *MLH1*, *MSH2* e *PMS2* foram realizados nos pacientes e a freqüência de mutação patogênica em um dos genes estudados estão representados na Tabela 24.

4.2.3 Seqüenciamento de genes de reparo

Tabela 24 - Freqüência de mutação em genes de reparo.

Genes de reparo	n.	%
sem mutação	17	39,5
mutação patogênica	26	60,5
Total	43	100,0

A Figura 10 ilustra a freqüência de mutação patogênica detectada por genes de reparo.

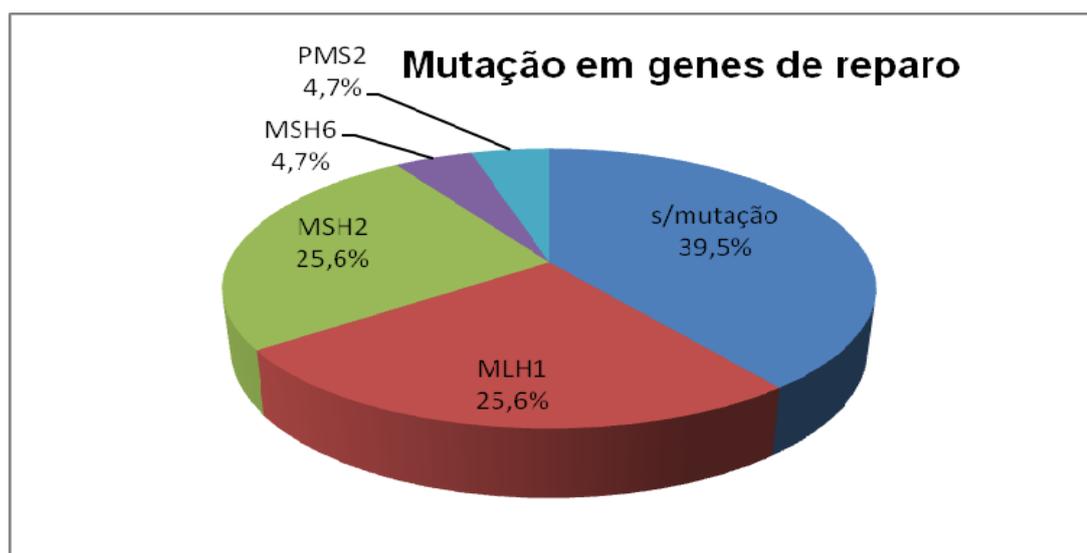


Figura 10 - Freqüência de mutação em gene de reparo.

A Figura 11 mostra a participação de cada gene nas mutações encontradas sendo que as mutações em genes principais somou 84,6%.

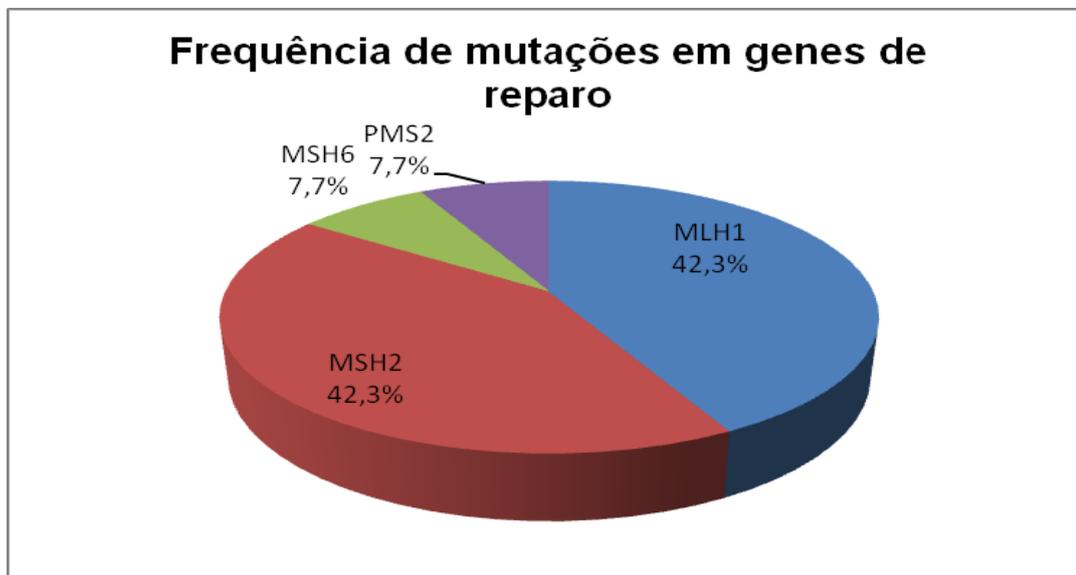


Figura 11 - Frequência de mutações patogênicas nos genes estudados.

Os tipos de mutação encontrada e a sua frequência estão representadas na Tabela 25.

Tabela 25 - Frequência dos tipos de mutações encontradas em genes de reparo.

Tipo de mutação	n.	%
<i>missense</i>	6	23,1
<i>nonsense</i>	6	23,1
<i>frameshift</i>	11	42,3
sítio <i>splicing</i>	2	7,7
deleção	1	3,8
Total	26	100,0

A Tabela 26 ilustra a distribuição em exons das mutações patogênicas encontradas em cada um dos genes estudados.

Tabela 26 - Frequência da localização (exon) da mutação.

Gene	Exon	n.	%
<i>MLH1</i>	6	1	9,1
	7	2	18,2
	9	1	9,1
	10	2	18,2
	13	1	9,1
	17	1	9,1
	18	2	18,2
	19	1	9,1
<i>MSH2</i>	9	2	18,2
	11	1	9,1
	12	1	9,1
	13	5	45,5
	15	1	9,1
	16	1	9,1
<i>MSH6</i>	4	1	50,0
	9	1	50,0
<i>PMS2</i>	11	2	100,0

Na Figura 12 ilustra a classificação das mutações segundo as mutações maiores (*frameshift* ou *nonsense*) com proteína truncada das demais formas de mutações.

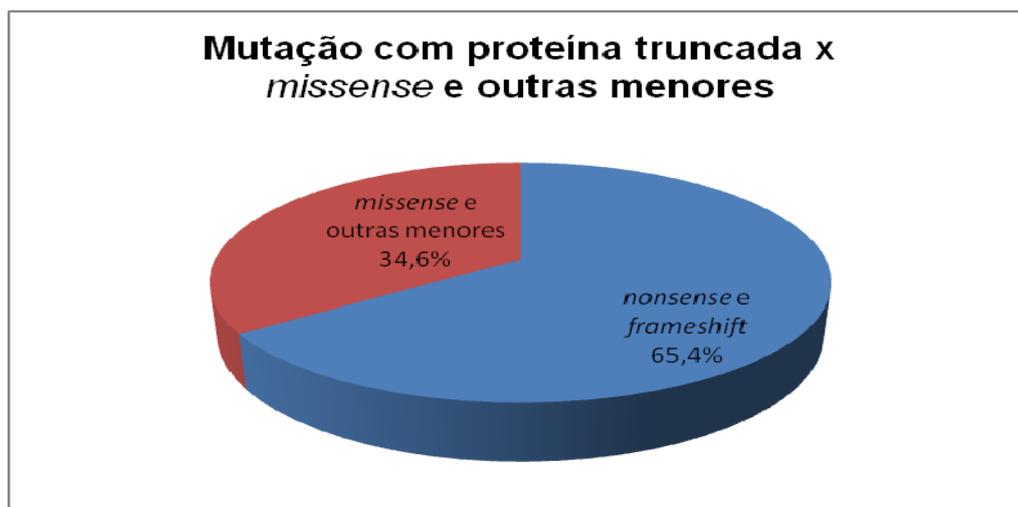


Figura 12 - Tipo de mutação detectada.

A Tabela 27 mostra as mutações ainda não descritas previamente nas bases de dados disponíveis.

Tabela 27 - Mutação novas detectadas.

Genes de reparo			
Mutação inédita	n.	%	
sim	13	50,0	
não	13	50,0	
Total	26	100,0	

A Tabela 28 ilustra a forma de definição de patogenicidade das mutações detectadas.

Tabela 28 - Determinação de patogenicidade.

Definição de patogenicidade	n.	%
literatura	5	19,2
Polyphen	1	3,8
prot truncada	11	42,3
Sift e Polyphen	1	3,8
proteína truncada e literatura	8	30,8
Total	26	100,0

Na Tabela 29 foi realizada a correlação entre os resultados de imunohistoquímica com os de sequenciamento para detecção de mutação em genes de reparo. Houve concordância e coerência para os métodos em 24/28 casos. Não foi concordante em 4/28, sendo em dois detectada mutação em *MSH2* e *MLH1* mas não houve repercussão na imunohistoquímica e em 2 casos com ausência de proteína não foi detectado mutação em genes correspondentes.

Tabela 29 - Correlação entre os achados de IHQ com os achados de mutação em genes de reparo.

IHQ (proteínas de reparo)	mutação	n	%
MLH1 e PMS2	<i>MLH1</i>	4	14,3
MSH2 e MSH6	<i>MSH2</i>	9	32,1
PMS2	<i>MLH1</i>	4	14,3
MSH2 e MSH6	(-)	2	7,1
Positivo	<i>MSH2</i>	1	3,6
Positivo	<i>MLH1</i>	1	3,6
Positivo	(-)	7	25,0
Total		28	100,0

Na Tabela 30 está representada a correlação entre os achados de instabilidade de microssatélites e o de mutação em genes de reparo. A instabilidade de microssatélites esteve associado com mutação em gene de reparo em 8/10 casos. Em 1 caso de MSI-S estava relacionado com mutação em gene *MLH1* e 1 caso de MSI-S não foi detectado mutação em gene de reparo.

Tabela 30 - Correlação entre os achados de instabilidade de microssatélites com os de mutação em genes de reparo.

MSI	Mutação	n	%
MSI-H	<i>MSH2</i>	5	50,0
MSI-H	<i>MLH1</i>	1	10,0
MSI-H	<i>PMS2</i>	1	10,0
MSI-L	<i>MSH2</i>	1	10,0
MSI-S	<i>MLH1</i>	1	10,0
MSI-S	s/mutação	1	10,0
Total		10	100,0

As Figuras 13 a 17 mostram nos pacientes estudados a cromatografia segmentar do seqüenciamento do gene de reparo com os principais tipos de mutações detectadas.

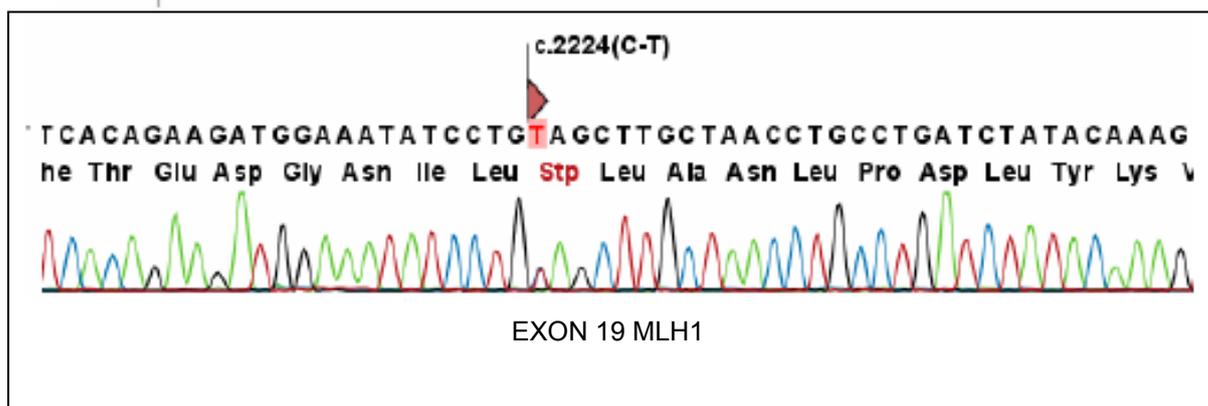


Figura 13 - Ilustra uma mutação encontrada no gene MLH1 no exon 19 do tipo *nonsense* com troca de C por T no códon 2224 modificando o aminoácido Glicina por um *Stop codon* e uma terminação prematura da proteína.

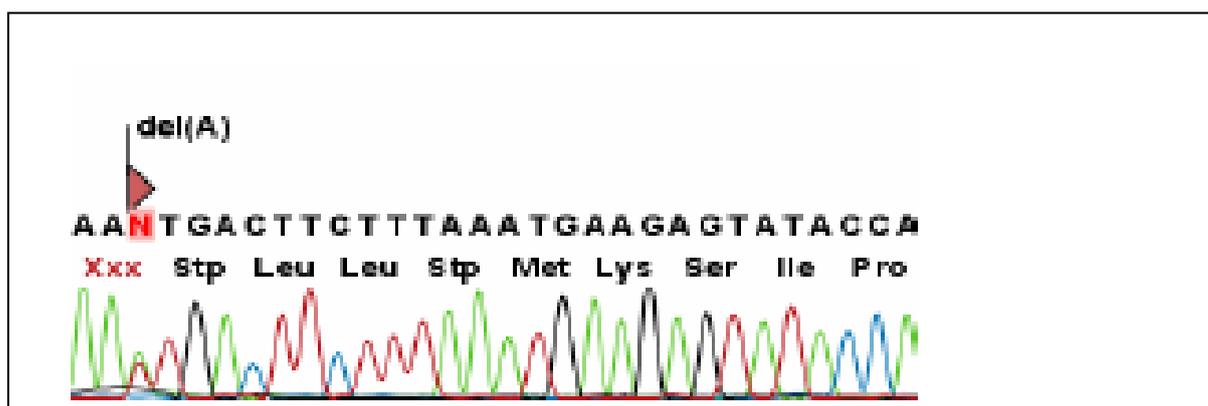


Figura 14 - Mostra exemplo de mutação do tipo *frameshift* com deleção de A na posição de códon 1666 havendo troca de leucina desta posição e *stop codon* adiante por troca na fase de leitura (*frameshift*) e interrupção de leitura e terminação prematura da proteína.

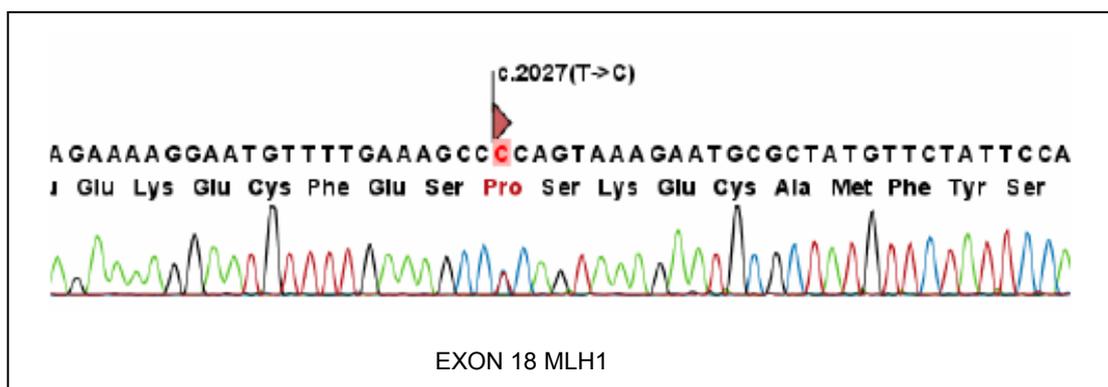


Figura 15 - Ilustra uma mutação *missense* no cólon 2027 houve uma troca de T por C com a troca de um único aminoácido de leucina por prolina.

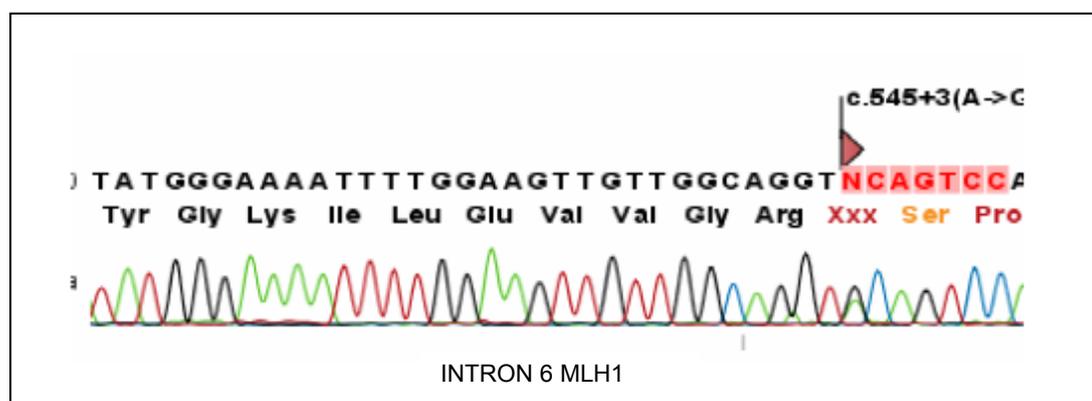


Figura 16 - Ilustra uma mutação em sítio de *splicing*

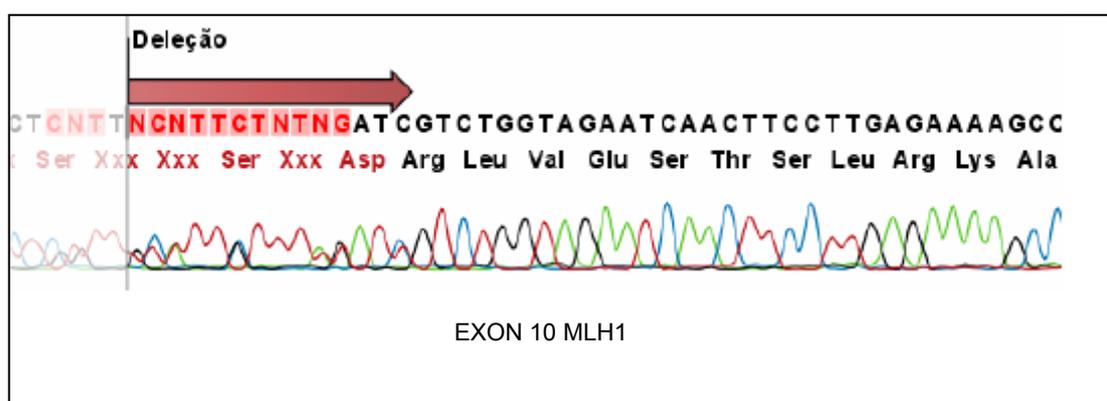


Figura 17 - Ilustra mutação com deleção

A relação das mutações encontradas nos genes de reparo, o tipo e mutação, o gene mutado e a definição da patogenicidade da mutação estão representados na Tabela 31.

Tabela 31 - Relação das mutações encontradas, localização, tipo e a definição da patogenicidade.

Fam.	Mutação	tipo	Gene	definição de patogenicidade
SL-1	c.545+3(A>G)	<i>s. splicing</i>	<i>MLH1</i>	literatura
SL-5	c.2525_2526delAG; p.Glu483X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada
SL-6	c.1447G>T; p.Glu483X	<i>nonsense</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-8	c.1667delT; p.Leu556X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada
SL-15	c.2187G>T; p.Met7229Ile	<i>missense</i>	<i>MSH2</i>	Sift e Polyphen
SL-20	c.2152C>T; p.Gln718X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-18	c.588+G>C	<i>missense</i>	<i>MLH1</i>	literatura
SL-19	c.2224C>T; p.Gln742X	<i>nonsense</i>	<i>MLH1</i>	prot truncada
SL-25	c.2131C>T; p.Arg711X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-29	c.588+2T>A	<i>s. splicing</i>	<i>MLH1</i>	prot truncada
SL-31	c.791-6_793del	deleção	<i>MLH1</i>	prot truncada
SL-36	c.2027T>C; p.Leu676Pro	<i>missense</i>	<i>MLH1</i>	literatura
SL-38	c.2152C>T; p.Gln718X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-39	c.1967_1970dup; p.Phe657LeufsX3	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada
SL-40	c.1444>T; p.Arg482X	<i>nonsense</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada
SL-44	c.942+3A>T	<i>nonsense</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-47	c.2349_2380del; p.Ala794NisfsX9 c.1853delAinsTTCTT;	<i>frameshift</i>	<i>MSH6</i>	prot truncada
SL-54	p.Lys618IlefsX4	<i>frameshift</i>	<i>MLH1</i>	prot truncada
SL-61	c.1211C>G; p.Pro404Arg	<i>missense</i>	<i>PMS2</i>	Polyphen
SL-72	c.2152C>T; p.Gln718X	<i>frameshift</i>	<i>MSH2</i>	prot truncada e literatura
SL-94	c.1459C>T; p.Arg487X	<i>nonsense</i>	<i>MLH1</i>	prot truncada e literatura
SL-92	c.1975C>T; p.Arg659X	<i>nonsense</i>	<i>MLH1</i>	prot truncada e literatura
SL-83	c.1239Dup; D414Rfs45	<i>frameshift</i>	<i>PMS2</i>	prot truncada
SL-93	c.2041G>A; p.Ala681Thr	<i>missense</i>	<i>MLH1</i>	literatura
SL-21	c.779T>G; p.Leu260Arg	<i>missense</i>	<i>MLH1</i>	literatura
SL-30	c.3974_3976delAGA; p.Lys1325del	<i>frameshift</i>	<i>MSH6</i>	prot truncada

4.3 CORRELAÇÕES

4.3.1 Correlação com mutação em genes de reparo

Na Tabela 32 estão representados a correlação dos dados clínicos e patológicos do CCR do probando, e também dados referentes ao adenoma colorretal frente à mutação ou não nos genes de reparo. Foram considerados como grupo com mutação quando esta ocorria em qualquer dos 4 genes estudados, e quando não houve mutação encontrada foi considerado como sem mutação. Estão representado a frequência e a percentagem e a análise pelo método de Fisher ou qui-quadrado. Quando a diferença encontrada for significativa está representado o valor de p. Nas situações em que a significância estatística for próxima da significância o valor de p foi descrita, porém entre parênteses.

Tabela 32 - Correlação de variáveis clínicas e patológicas do CCR e adenomas dos probandos com os achados de mutações em genes de reparo.

Variável	Categoria	Mutação	Sem Mutação	p
Gênero	Masculino	11 (61,1%)	7 (38,9%)	ns
	Feminino	15 (60,0%)	10 (40,0%)	
Tumor de cólon	Único	17 (58,6%)	12 (41,4%)	ns
	Múltiplo	8 (72,7%)	3 (27,3%)	
Idade de diagnóstico CCR	<50 anos	18 (66,7%)	9 (33,3%)	ns
	>50 anos	7 (53,8%)	6 (46,2%)	
Adenoma	Sim	17 (63,0%)	10 (37,0%)	ns
	Não	9 (56,3%)	7 (43,8%)	
Idade de adenoma	<40 anos	3 (75,0%)	1 (25,0%)	ns
	>40 anos	14 (60,9%)	9 (39,1%)	
Tumor de cólon proximal x distal	Proximal	15 (83,3%)	3 (16,7%)	0,005
	Distal	5 (33,3%)	10 (66,7%)	
Estadiamento T tumor de cólon	T1-T2	8 (57,1%)	6 (42,9%)	ns
	T3-T4	15 (71,4%)	6 (28,6%)	
Estadiamento N tumor de cólon	N0	20 (66,7%)	10 (33,3%)	ns
	N1-N2	4 (57,1%)	3 (42,9%)	
Estadiamento M tumor de cólon	M0	24 (63,2%)	14 (36,8%)	ns
	M1	1 (50,0%)	1 (50,0%)	
Grau de diferenciação CCR	G1	6 (66,7%)	3 (33,3%)	ns
	G2-G3	17 (77,3%)	5 (22,7%)	
Invasão vascular sanguínea	Sim	1 (25,0%)	3 (75,0%)	ns
	Não	24 (66,7%)	12 (33,3%)	
Invasão vascular linfática	Sim	1 (20,0%)	4 (80,0%)	(0,056)
	Não	24 (68,6%)	11 (31,4%)	
Invasão perineural	Sim	1 (25,0%)	3 (75,0%)	ns
	Não	24 (66,7%)	12 (33,3%)	
Componente mucinoso	Sim	8 (72,7%)	3 (27,3%)	ns
	Não	16 (61,5%)	10 (38,5%)	
Tumor cribiforme	Sim	2 (100,0%)	0 (0,0%)	ns
	Não	23 (60,5%)	15 (37,5%)	
"Chron's like"	Sim	0 (0,0%)	1 (100,0%)	ns
	Não	25 (64,1%)	14 (35,9%)	
Infiltrado linfocitário	Sim	13 (78,5%)	4 (23,5%)	ns
	Não	12 (52,2%)	11 (47,8%)	
Reação desmoplásica	Sim	6 (85,7%)	1 (14,3%)	ns
	Não	19 (57,6%)	14 (42,4%)	
Histologia SL	Sim	10 (71,4%)	4 (28,6%)	ns
	Não	15 (57,7%)	11 (42,3%)	
SLD em pacientes com CCR	≤5 anos	5 (45,5%)	6 (54,5%)	ns
	>5 anos	18 (75,0%)	6 (25,0%)	

A correlação mostrada na Tabela 33 foi realizada com os tumores extracolônicos dos probandos frente a presença ou não de mutação nos genes de reparo.

Tabela 33 - Correlação de tumores extracolônicos dos probandos com os achados de mutações em genes de reparo.

Variável	Categoria	Mutação	Sem Mutação	p
Tumor de endométrio	Sim	4 (66,7%)	2 (33,3%)	ns
	Não	22 (59,5%)	15 (40,5%)	
Tumor de estômago	Sim	1 (50%)	1 (50%)	ns
	Não	25 (61,0%)	16 (39,0%)	
Tumor de intestino delgado	Sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	Não	26 (61,9%)	16 (38,1%)	
Tumor de pelve renal e ureter	Sim	1 (100%)	0 (0%)	ns
	Não	25 (59,5%)	17 (40,5%)	
Tumor de pâncreas	Sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	Não	25 (59,5%)	17 (40,5%)	
Tumor de extracolônico SL	Sim	7 (70,0%)	3 (30,0%)	ns
	Não	19 (57,6%)	14 (42,4%)	
Número de tumores malignos	1	11 (47,8%)	12 (52,2%)	(0,057)
	>1	15 (78,9%)	4 (21,1%)	
Tumor de mama	sim	2 (50,0%)	2 (50,0%)	ns
	Não	24 (61,5%)	15 (38,5%)	

Na Tabela 34 está representada a correlação com os dados relativos à família com a presença ou não de mutação patológica nos genes de reparo.

Tabela 34 - Correlação de variáveis referentes às famílias com os achados de mutações em genes de reparo.

Variável	Categoria	Mutação	Sem Mutação	P
N. de familiares com CCR	≤4	20 (62,5%)	1 (37,5%)	ns
	>4	6 (54,5%)	5 (45,5%)	
N. de familiares com CCR	≤4	20 (62,5%)	1 (37,5%)	ns
	>4	6 (54,5%)	5 (45,5%)	
Idade de familiares com CCR mais jovem	≤50 anos	20 (69,0%)	9 (31,0%)	ns
	>50 anos	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
Adenoma na família	Sim	17 (58,6%)	12 (41,4%)	ns
	Não	8 (61,5%)	5 (38,5%)	
Tumor de endométrio na família	Sim	9 (69,2%)	4 (30,8%)	ns
	Não	17 (56,7%)	13 (43,3%)	
Tumor de estômago na família	Sim	9 (60,0%)	6 (40,0%)	ns
	Não	17 (60,7%)	11 (39,3%)	
Tumor hepatobiliar na família	Sim	2 (100,0%)	0 (0,0%)	ns
	Não	24 (58,5%)	17 (41,5%)	
Tumor de intestino delgado na família	Sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	Não	25 (61,0%)	16 (39,0%)	
Tumor ovário	Sim	3 (100,0%)	0 (0,0%)	ns
	Não	23 (57,5%)	17 (42,5%)	
Tumor de pelve renal e ureter	Sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	Não	25 (61,0%)	16 (39,0%)	
Tumor de pâncreas	Sim	2 (66,7%)	1 (33,3%)	ns
	Não	24 (60,0%)	16 (40,0%)	
Tumor de SNC	Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	0,028
	Não	25 (67,6%)	12 (32,4%)	
Tumor sebáceo	Sim	2 (100%)	0 (0%)	ns
	Não	24 (58,5%)	17 (41,5%)	
Tumor extracolônico SL na família	Sim	17 (53,1%)	15 (46,9%)	ns
	Não	9 (81,8%)	2 (18,2%)	
N. tumor extracolônico SL na família	≤3	10 (83,3%)	2 (16,7%)	(0,085)
	>3	16 (51,6%)	15 (48,4%)	
Tumor de mama na família	Sim	4 (36,4%)	7 (63,6%)	(0,080)
	Não	22 (68,8%)	10 (31,3%)	
Densidade de tumor na família	≤0,25	12 (46,2%)	14 (53,8%)	0,026
	0,26-1,0	14 (82,4%)	3 (17,6%)	
Número de familiares com tumor	≤5	16 (66,7%)	8 (33,3%)	ns
	>5	10 (52,6%)	9 (47,4%)	

Na Tabela 35 notamos correlação das mutações em genes de reparo com os achados de alteração de proteínas de reparo analisada por imunohistoquímica nos tumores em probandos, assim como os achados de instabilidade de microssatélites.

Tabela 35 - Correlação de variáveis imunohistoquímica e de instabilidade de microssatélites do CCR com os achados de mutações em genes de reparo.

Variável	Categoria	Mutação	Sem Mutação	p
IHQ para MLH1	ausente	4 (100,0%)	0 (0,0%)	ns
	presente	16 (64,0%)	9 (36,0%)	
IHQ para MSH2	ausente	9 (81,8%)	2 (18,2%)	ns
	presente	11 (61,1%)	7 (38,9%)	
IHQ para MSH6	ausente	9 (81,8%)	2 (18,2%)	ns
	presente	11 (61,1%)	7 (38,9%)	
IHQ para PMS2	ausente	8 (100,0%)	0 (0,0%)	0,029
	presente	11 (55,0%)	9 (45,0%)	
IHQ para proteína de reparo	ausente	17 (89,5%)	2 (10,5%)	0,002
	presente	3 (30,0%)	7 (70,0%)	

4.3.2 Correlação com mutação em gene *MSH2*

A seguir foi realizada a mesma correlação das variáveis com mutação isolada para os genes mais frequentes, *MSH2* e *MLH1*. Iniciamos com o gene *MSH2* correlacionando com os dados demográficos, clínicos e anatomopatológicos do CCR, e a sobrevida global dos pacientes. Tabela 36.

Tabela 36 - Correlação de dados demográficos, e os relativos ao CCR e adenoma dos probandos com achados de mutação em gene *MSH2*.

	Categoria	Mutação <i>MSH2</i>	Sem Mutação <i>MSH2</i>	p
Gênero	masculino	3 (16,7%)	15 (83,3%)	ns
	feminino	8 (32,0%)	17 (68,0%)	
Tumor de cólon	único	6 (20,7%)	23 (79,3%)	ns
	múltiplo	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
Idade de diagnóstico de tumor de cólon	≤50 anos	6 (22,2%)	21 (77,8%)	ns
	>50 anos	5 (38,5%)	8 (61,5%)	
Adenoma	sim	7 (25,9%)	20 (74,1%)	ns
	não	4 (25,0%)	12 (75,0%)	
Idade de adenoma	≤40 anos	0 (0%)	4 (100%)	ns
	>40 anos	7 (30,4%)	16 (69,6%)	
Tumor de cólon proximal x distal	proximal	4 (22,2%)	14 (77,8%)	ns
	distal	3 (20,0%)	12 (80,0%)	
Estadiamento T tumor de cólon	T1-T2	3 (21,4%)	11 (78,6%)	ns
	T3-T4	7 (33,3%)	14 (66,7%)	
Estadiamento N tumor de cólon	N0	9 (30,0%)	21 (70,0%)	ns
	N1-N2	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Estadiamento M tumor de cólon	M0	11 (28,9%)	27 (77,1%)	ns
	M1	0 (0%)	2 (100%)	
Grau de diferenciação tumor de cólon	G1	4 (44,4%)	5 (55,6%)	ns
	G2-G3	6 (27,3%)	16 (72,7%)	
Invasão vascular sanguínea	sim	0 (0%)	4 (100%)	ns
	não	11 (30,6%)	25 (69,4%)	
Invasão vascular linfática	sim	0 (0%)	5 (100%)	ns
	não	11 (31,4%)	24 (68,6%)	
Invasão perineural	sim	0 (0%)	4 (100%)	ns
	não	11 (30,6%)	25 (69,4%)	
Componente mucinoso	sim	4 (36,4%)	7 (63,6%)	ns
	não	6 (23,1%)	20 (76,9%)	
Cribiforme	sim	2 (100,0%)	0 (0,0%)	(0,071)
	não	9 (23,7%)	29 (76,3%)	
"Chron's like"	sim	0 (0,0%)	1 (100,0%)	ns
	não	11 (28,2%)	28 (71,8%)	
Infiltrado linfocitário	sim	8 (47,1%)	9 (52,9%)	0,03
	não	3 (13,0%)	20 (87,0%)	
Reação desmoplásica	sim	8 (47,1%)	9 (52,9%)	ns
	não	3 (13,0%)	20 (87,0%)	
Histologia SL	sim	6 (42,9%)	8 (57,1%)	ns
	não	5 (19,2%)	21 (80,8%)	
SLD em pacientes com CCR	≤5 anos	3 (27,3%)	8 (72,7%)	ns
	>5 anos	8 (33,3%)	16 (66,7%)	

A Tabela 37 mostra a correção da mutação em gene *MSH2* com os tumores extracolônicos dos probandos.

Tabela 37 - Correlação de tumores extracolônicos em probandos com achados de mutação em gene *MSH2*.

	Categoria	Mutação <i>MSH2</i>	Sem Mutação <i>MSH2</i>	p
Tumor de endométrio	sim	2 (33,3%)	4 (66,7%)	ns
	não	9 (24,3%)	28 (75,7%)	
Tumor de estômago	sim	0 (0%)	2 (100%)	ns
	não	11 (26,8%)	30 (73,2%)	
Tumor de fígado	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de intestino delgado	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de pelve renal e ureter	sim	1 (100%)	0 (0%)	ns
	não	10 (23,8%)	32 (76,2%)	
Tumor de pâncreas	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de extracolônico SL	sim	3 (30,0%)	7 (70,0%)	ns
	não	8 (24,2%)	25 (75,8%)	
Tumor de mama	sim	0 (0%)	4 (100%)	ns
	não	11 (28,2%)	28 (71,8%)	
Número de tumores malignos	≤1	4 (17,4%)	19 (82,6%)	ns
	>1	7 (36,8%)	12 (63,2%)	

A Tabela 38 correlaciona os dados relativos à família com achados de mutação em gene *MSH2*.

Tabela 38 - Correlação de dados relativos às famílias com achados de mutação em gene *MSH2*.

	Categoria	Mutação <i>MSH2</i>	Sem Mutação <i>MSH2</i>	P
N. de familiares com CCR	≤4	8 (25,0%)	24 (75,0%)	ns
	>4	3 (27,3%)	8 (72,7%)	
N. de familiares com CCR	≤4	8 (25,0%)	24 (75,0%)	ns
	>4	3 (27,3%)	8 (72,7%)	
Idade familiares com CCR	≤50 anos	7 (24,1%)	22 (75,9%)	ns
	>50 anos	4 (36,4%)	7 (63,6%)	
Adenomas na família	sim	3 (12,5%)	21 (87,5%)	0,038
	não	8 (42,1%)	11 (57,9%)	
Tumor de endométrio na família	sim	4 (30,8%)	9 (69,2%)	ns
	não	7 (23,3%)	23 (76,7%)	
Tumor de estômago na família	sim	6 (40,0%)	9 (60,0%)	ns
	não	5 (17,9%)	23 (82,1%)	
Tumor hepatobiliar na família	sim	0 (0,0%)	2 (100,0%)	ns
	não	11 (26,8%)	30 (73,2%)	
Tumor de intestino delgado na família	sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	não	10 (24,4%)	31 (75,6%)	
Tumor de pelve renal e ureter na família	sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	não	10 (24,4%)	31 (75,6%)	
Tumor de ovário na família	sim	1 (33,3%)	2 (66,6%)	ns
	não	10 (25,0%)	30 (75,0%)	
Tumor de pâncreas na família	sim	1 (33,3%)	2 (66,6%)	ns
	não	10 (25,0%)	30 (75,0%)	
Tumor de SNC na família	sim	0 (0%)	6 (100%)	ns
	não	11 (29,7%)	26 (70,3%)	
Tumor sebáceo	sim	2 (100,0%)	0 (0,0%)	(0,061)
	não	9 (22,0%)	32 (78,0%)	
Tumor extracolônico SL na família	sim	9 (28,1%)	23 (71,9%)	ns
	não	2 (18,2%)	9 (81,8%)	
Tumor extracolônico SL na família	≤3	4 (33,3%)	8 (66,7%)	ns
	>3	7 (22,6%)	24 (77,4%)	
Tumor de mama na família	sim	0 (0%)	11 (100%)	0,041
	não	11 (34,4%)	21 (65,6%)	
Densidade de tumor na família	≤0,25	8 (30,8%)	18 (69,2%)	ns
	0,26-1,0	3 (17,6%)	14 (82,4%)	
Número de familiares com tumor	≤ 5	8 (33,3%)	16 (66,7%)	ns
	>5	3 (15,8%)	16 (84,2%)	

A Tabela 39 mostra a correlação das mutações em genes de reparo MSH2 com alterações em proteínas de reparo em estudo imunohistoquímico em tumores colorretais de probandos. Foi realizado também a correlação com instabilidade de microssatélites.

Tabela 39 - Correlação de dados relativos à imunohistoquímica e instabilidade de microssatélites do CCR os com achados de mutação em gene *MSH2*.

Variável	Categoria	Mutação <i>MSH2</i>	Sem Mutação <i>MSH2</i>	p
IHQ para MLH1	ausente	0 (0,0%)	4 (100,0%)	ns
	presente	10 (40,0%)	15 (60,0%)	
IHQ para MSH2	ausente	9 (81,8%)	2 (18,2%)	<0,001
	presente	1 (5,6%)	17 (94,4%)	
IHQ para MSH6	ausente	9 (81,8%)	2 (18,2%)	<0,001
	presente	1 (5,6%)	17 (94,4%)	
IHQ para PMS2	ausente	0 (0,0%)	8 (100,0%)	0,025
	presente	10 (50,0%)	10 (50,0%)	
IHQ para proteína de reparo	ausente	9 (47,4%)	10 (52,6%)	(0,098)
	presente	1 (11,1%)	8 (88,9%)	
Instabilidade de microssatélites	MSS MSI-L	1 (33,3%)	2 (66,6%)	ns
	MSI-H	5 (71,4%)	2 (28,6%)	

4.3.3 Correlação com mutação em gene *MLH1*

A Tabela 40 realizou a correlação da mutação no gene *MLH1* com fatores clínicos e patológicos do probando, seu CCR e adenoma colorretal além da sobrevida livre de doença em relação com CCR.

Tabela 40 - Correlação de dados clínicos e patológicos do CCR e adenoma dos probandos com mutação em gene *MLH1*.

Variável	Categoria	Mutação <i>MLH1</i>	Sem Mutação <i>MLH1</i>	p
Gênero	masculino	5 (27,8%)	13 (72,2%)	ns
	feminino	6 (24,0%)	19 (76,0%)	
Tumor de cólon	único	8 (27,6%)	21 (72,4%)	ns
	múltiplo	3 (27,3%)	6 (72,7%)	
Idade de diagnóstico de tumor de cólon	≤50 anos	10 (27,0%)	17 (63,0%)	(0,068)
	>50 anos	1 (7,7%)	12 (92,3%)	
Adenoma	sim	8 (29,6%)	19 (70,4%)	ns
	não	3 (18,8%)	13 (81,3%)	
Idade de adenoma	≤40 anos	3 (75,0%)	1 (25,0%)	(0,065)
	>40 anos	5 (21,7%)	18 (78,3%)	
Tumor de cólon proximal x distal	proximal	9 (50,0%)	9 (50,0%)	0,009
	distal	1 (6,7%)	14 (93,3%)	
Estadiamento T tumor de cólon	T1-T2	5 (35,7%)	9 (64,3%)	ns
	T3-T4	6 (28,6%)	15 (71,4%)	
Estadiamento N tumor de cólon	N0	9 (30,0%)	21 (70,0%)	ns
	N1-N2	2 (28,6%)	5 (71,4%)	
Estadiamento M tumor de cólon	M0	11 (28,9%)	27 (71,1%)	ns
	M1	0 (0%)	2 (100%)	
Grau de diferenciação tumor de cólon	G1	2 (22,2%)	7 (77,8%)	ns
	G2-G3	9 (40,9%)	13 (59,1%)	
Invasão vascular sanguínea	Sim	1 (25,0%)	3 (75,0%)	ns
	Não	10 (27,8%)	26 (72,2%)	
Invasão vascular linfática	Sim	1 (20,0%)	4 (80,0%)	ns
	Não	10 (28,6%)	25 (71,4%)	
Invasão perineural	Sim	0 (0,0%)	4 (100,0%)	ns
	Não	11 (30,6%)	25 (69,4%)	
Componente mucinoso	Sim	4 (36,4%)	7 (63,6%)	ns
	Não	7 (26,9%)	19 (73,1%)	
Tumor cribiforme	Sim	0 (0,0%)	2 (100,0%)	ns
	Não	11 (28,9%)	27 (71,1%)	
"Chron's like"	Sim	0 (0,0%)	1 (100,0%)	ns
	Não	11 (28,2%)	28 (71,8%)	
Infiltrado linfocitário	Sim	4 (23,5%)	13 (76,5%)	ns
	Não	7 (30,4%)	16 (69,6%)	
Reação desmoplásica	Sim	2 (28,6%)	5 (71,4%)	ns
	Não	9 (27,3%)	24 (72,7%)	
Histologia SL	Sim	4 (28,6%)	10 (71,4%)	ns
	Não	7 (26,9%)	19 (73,1%)	
SLD para CCR no probando	≤ 5 anos	1 (9,1%)	10 (90,9%)	ns
	>5 anos	9 (37,5%)	15 (62,5%)	

A Tabela 41 correlaciona mutação em gene *MLH1* com dados de tumores extracolônicos em probandos.

Tabela 41 - Correlação dos tumores extracolônicos dos probandos com mutação em gene *MLH1*.

Variável	Categoria	Mutação <i>MLH1</i>	Sem Mutação <i>MLH1</i>	p
Tumor de endométrio	sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	ns
	não	10 (27,0%)	27 (73,0%)	
Tumor de estômago	sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	não	10 (24,4%)	31 (75,6%)	
Tumor hepatobiliar	sim	1 (100,0%)	0 (0,0%)	ns
	não	10 (23,8%)	32 (76,2%)	
Tumor de intestino delgado	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de pelve renal e ureter	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de pâncreas	sim	0 (0%)	1 (100%)	ns
	não	11 (26,2%)	31 (73,8%)	
Tumor de extracolônico SL	sim	3 (30,0%)	7 (70,0%)	ns
	não	8 (24,2%)	25 (75,8%)	
Tumor de mama	sim	1 (25,0%)	3 (75,0%)	ns
	não	10 (25,6%)	29 (74,4%)	
Número de tumores malignos	1	5 (21,7%)	18 (78,3%)	ns
	>1	6 (31,6%)	13 (68,4%)	

A Tabela 42 mostra a correlação da mutação em gene de reparo *MLH1* com os dados relativos à família.

Tabela 42 - Correlação de dados familiares com mutação em gene *MLH1*.

Variável	Categoria	Mutação <i>MLH1</i>	Sem Mutação <i>MLH1</i>	p
N. de familiares com CCR	≤4	8 (25,0%)	24 (75,0%)	ns
	>4	3 (27,3%)	8 (72,7%)	
Idade familiares com CCR	≤50 anos	11 (37,9%)	18 (62,1%)	0,019
	>50 anos	0 (0,0%)	11 (100,0%)	
Adenomas na família	Sim	8 (27,6%)	21 (72,4%)	ns
	Não	3 (23,1%)	10 (76,9%)	
Tumor de endométrio na família	Sim	4 (30,8%)	9 (69,2%)	ns
	Não	7 (23,3%)	23 (76,7%)	
Tumor de estômago na família	Sim	3 (20,0%)	12 (80,0%)	ns
	Não	8 (28,6%)	20 (71,4%)	
Tumor hepatobiliar na família	Sim	1 (50,0%)	1 (50,0%)	ns
	Não	10 (24,4%)	31 (75,6%)	
Tumor de intestino delgado na família	Sim	0 (0%)	2 (100%)	ns
	Não	11 (26,8%)	30 (73,2%)	
Tumor de pelve renal e ureter na família	Sim	0 (0%)	2 (100%)	ns
	Não	11 (26,8%)	30 (73,2%)	
Tumor de ovário na família	Sim	1 (33,3%)	2 (66,7%)	ns
	Não	10 (25,0%)	30 (75,0%)	
Tumor de pâncreas na família	Sim	0 (0,0%)	3 (100,0%)	ns
	Não	11 (27,5%)	29 (72,5%)	
Tumor de SNC na família	Sim	1 (16,7%)	5 (83,3%)	ns
	Não	10 (27,0%)	27 (73,0%)	
Tumor sebáceo	Sim	0 (0%)	2 (100%)	ns
	não	11 (26,8%)	30 (73,2%)	
Tumor extracolônico SL na família	sim	6 (18,8%)	26 (81,3%)	ns
	não	5 (45,5%)	6 (54,5%)	
Número de tumor extracolônico SL na família	≤4	3 (25,0%)	9 (75,0%)	ns
	>4	8 (25,8%)	23 (74,2%)	
Tumor de mama na família	sim	2 (18,2%)	9 (81,8%)	ns
	não	9 (28,1%)	23 (71,9%)	
Densidade de tumor na família	≤0,25	3 (11,5%)	23 (88,5%)	0,014
	0,26-1,0	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
Número total de tumores na família	≤5	6 (25,0%)	18 (75,0%)	ns
	>5	5 (26,3%)	14 (73,7%)	
SLD para CCR no probando	≤ 5 anos	1 (9,1%)	10 (90,9%)	ns
	>5 anos	9 (37,5%)	15 (62,5%)	

Realizou-se na Tabela 43 a correlação dos dados de imunohistoquímica para proteína de reparo e instabilidade de microssatélites com mutação em gene *MLH1*

Tabela 43 - Correlação de dados imunohistoquímica e de instabilidade de microssatélites com mutação em gene *MLH1*.

Variável	Categoria	Mutação <i>MLH1</i>	Sem Mutação <i>MLH1</i>	p
IHQ para <i>MLH1</i>	ausente	3 (75,0%)	1 (25,0%)	(0,058)
	presente	5 (20,8%)	19 (79,2%)	
IHQ para <i>MSH2</i>	ausente	0 (0,0%)	11 (100,0%)	0,01
	presente	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
IHQ para <i>MSH6</i>	ausente	0 (0,0%)	11 (100,0%)	0,01
	presente	8 (47,1%)	9 (52,9%)	
IHQ para <i>PMS2</i>	ausente	7 (87,5%)	1 (12,5%)	<0,001
	presente	1 (5,0%)	19 (95,0%)	
IHQ para proteína de reparo	ausente	7 (36,8%)	12 (63,2%)	ns
	presente	1 (11,1%)	8 (88,9%)	
Instabilidade de microssatélites	MSS MSI-L	1 (33,3%)	2 (66,7%)	ns
	MSI-H	1 (14,3%)	6 (85,7%)	

DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Foram incluídos 37 pacientes definidos por meio dos critérios clínicos de Amsterdam para HNPCC somados a 6 pacientes com diagnóstico de SL confirmado por estudo molecular à partir de um grupo suspeito, definido pelos critérios de Bethesda, totalizando 43 probandos. O objetivo de incluir somente os pacientes com diagnóstico clínico ou molecular tem a finalidade de definir um grupo de pacientes com elevado risco de desenvolvimento de tumores e uma alta probabilidade de detecção de mutação em genes de reparo. Todos os probandos foram estudados quanto aos genes de reparo com seqüenciamento sendo definido um grupo com identificação de mutação e outro sem identificação. Conforme nomenclatura atual, este último grupo é denominado de síndrome X, ou seja, pacientes com critérios clínicos para HNPCC porém sem mutação identificada e o grupo com mutação identificada como SL (LINDOR et al. 2005). O estudo caracterizou do ponto de vista clínico, anatomopatológico e de histórico na família cada um dos grupos realizando uma comparação destes fatores quanto a mutação em genes de reparo, cada um dos genes mais importantes genes estudados (*MSH2* e *MLH1*). Considerando o grupo inicial de estudo pelos critérios de Bethesda havia 53 probandos destes foram detectados de mutação em 6 deles revelando uma sensibilidade de 11,3% (considerando os 4 genes estudados).

A maioria dos probandos, como esperado, se apresentaram com tumores colorretais (40/43), e alguns com manifestação de outros tumores colorretais ou extracolônicos, podendo ser sincrônicos ou metacrônicos, chegando até um número total de 4 tumores primários distintos em um mesmo indivíduo. A incidência de tumores múltiplos neste grupo foi de 26,5% considerando somente os CCR e de 45,2% incluindo os tumores extracolônicos. Na população geral esse índice de tumores múltiplos colorretais é de no máximo 5%, revelando-se neste grupo com elevado risco de novos tumores ao longo da vida.

Considerando somente os tumores colorretais a idade de surgimento do primeiro tumor nos probandos ocorreu em idade antes dos 50 anos em 67,5% da casuística, sendo esta uma das principais características da doença. Estes dois fatores apontados são dados que habitualmente chamam a atenção do clínico que assiste ao paciente para a suspeita de síndrome hereditária, ou seja a idade precoce e a existência de tumores múltiplos em um mesmo indivíduo.

A localização dos tumores de cólon em porções proximais ao ângulo esplênico ocorreu em 44,4% dos pacientes, sendo esta também uma das características da SL. Nesta casuística, considerando somente os probandos a frequência de tumores colorretais a incidência de tumores sincrônicos foi de 19,4% também acima do esperado para a população geral em tumores esporádicos.

O estadiamento dos tumores colorretais dos probandos de cada família, observa-se que apresentam uma extensão local avançada, ou seja

tumores T3 e T4, em uma proporção elevada, de 60,0%, no entanto observa-se uma baixa incidência comprometimento linfonodal e de doença metastática respectivamente 18,9% e 5,0%, indicando tumores localmente extensos com baixa disseminação linfática e hematogênica o que condiz com as características dos tumores relacionados à SL (LYNCH et al 1999; BUCKOWITZ et al 2005; VASEN 2005; DRESCHER et al. 2010). Um outro aspecto que também chama a atenção é em relação à incidência de infiltrado linfocitário peritumoral que ocorreu em 42,5%, indicando possivelmente uma maior reação imunológica-inflamatória peritumoral o que vai de encontro com a tendência dos tumores relacionados a SL que relacionam este aspecto com aumento de reação inflamatória e melhora na sobrevida (BENNETT et al. 1998; DOLCETTI et al. 1999; OKADA et al. 2000; SMYRK et al. 2001; OKANO et al. 2003; DRESCHER et al. 2009). Na prática observa-se tumores de grande volume, com achados indicando lesões muito infiltrativas, podendo determinar cirurgias extensas com ressecção de múltiplos órgãos, por uma tendência a comprometimento de estruturas vizinhas. Apesar disto há um menor risco de comprometimento linfonodal e de disseminação à distância. Sabe-se também que estes pacientes apresentam um melhor prognóstico em relação aos tumores não hereditários, sendo que nesta casuística a sobrevida livre de doença atuarial referentes aos tumores colorretais, foi de mais de 90%, a despeito de muitos casos apresentarem também CCR múltiplos, entre outros tumores extracolônicos. Os pacientes que evoluíram com doença maligna em atividade ou doença incurável, não estava em sua maioria relacionados ao

CCR e sim a tumores extracolônicos (um paciente com tumor de pulmão e outro com de mama e um paciente com tumor de reto avançado). A proporção tumores de alto grau foi de 67,9%, elevado é também relacionados à característica da síndrome, que paradoxalmente apresenta característica de mal prognóstico assim como tumores em anel de sinete e com presença de mucina, fato este parcialmente explicado pelo tipo de mucina presente nos tumores da SL com menor expressão de MUC1 (YOU et al. 2006; LUGLI et al. 2007). Por outro lado a invasão vascular linfática, sanguínea e perineural não se mostraram elevados variando de 10,0 a 12,5%. Este dado corrobora com os achados de baixo comprometimento linfonodal nestes pacientes. O componente mucinoso nos tumores foi observado em 29,4%, este juntamente com infiltrado linfocitário semelhante à doença de Crohn (“Chron’s like”) e o aspecto de tumor tipo cribiforme são características histológicas que podem sugerir a síndrome hereditária, no entanto estes dois últimos aspectos foi pouco observado neste grupo.

Dentre os probandos ainda o índice de tumores extracolônicos encontrado foi de 25%, considerando que a maioria apresentava já um tumor de cólon, este tumor participava como um segundo tumor primário, sendo o de endométrio na mulher o tumor mais prevalente. Em 46,2% dos pacientes considerando todos os tumores malignos, apresentavam pelo menos 2 tumores distintos. A existência de 2 tumores ocorreu em 27,5%, 3 tumores em 15,0% e em um paciente (2,5%) houve a detecção de 4 tumores.

Observou-se nesta série um número elevado de tumores mama, que não faz parte dos tumores relacionados à SL. Ela figura como o terceiro

tumor mais freqüente entre os probandos, após os tumores colorretais e o de endométrio. Além disso os tumores que fazem parte dos tumores extracolônicos da SL tiveram uma contribuição menor do que os tumores de mama como os tumores de estômago, pâncreas, SNC, pelve renal ou ureter e o intestino delgado entre os probandos. São todos considerados de incidência inferior a 10% na SL.

Como ocorreu com os probandos, dentro das famílias, o tumor colorretal foi o mais incidente com uma variação de 0 a 10 indivíduos na família com CCR. O tumor de endométrio assume o segundo tumor mais freqüente na família, seguido de estômago e mama como ocorreu com os probandos. Os outros tumores relacionados à SL se mostraram com uma incidência inferior. A média na família foi de 6,6 tumores por família, tendo uma variação de 2 tumores a 16 tumores por família. Os tumores de estômago figura normalmente na terceira posição entre os tumores relacionados a SL (GOECKE et al. 2006).

Apenas uma parcela dos pacientes tiveram os tumores estudados por imunohistoquímica para as proteínas de reparo por dificuldade em obtenção de tecido tumoral adequado para isto. Foram estudados as proteínas de reparo em 26 pacientes, probandos, com resultado normal para todas as proteínas encontrada em 9 e anormalidades de alguma das quatro proteínas em 17. As combinações de ausência de expressão de 2 das proteínas ocorreu com a associação de ausência de MSH2 com MSH6 e o MLH1 com PMS2 como é descrito. Esta situação ocorreu em 2 casos com

associação e ausência de expressão de MLH1 e PMS2 e em 11 casos de ausência de expressão para o conjunto MSH2 e MSH6.

Os achados de imunohistoquímica apresentaram uma correspondência e coerência com os de estudo de mutação. A correspondência maior foi com o *MSH2* com as mutação em genes correspondente no tecido tumoral. A ausência de expressão da proteína MSH2 foi observada em 11 com e que foram os mesmos pacientes que apresentaram ausência concomitante para a proteína MSH6 destes 9 apresentaram mutação em gene *MSH2*. Em 2 pacientes não foi detectado mutação em gene de reparo pelos método de seqüenciamento utilizado. A ausência da proteína de reparo indica possível defeito na proteína que não foi identificado no seqüenciamento, havendo a possibilidade de grandes deleções que não são detectados por este método. Os genes de reparo maiores, MSH2 e *MLH1*, são estabilizados pelos correspondentes menores que incluem o MSH6 e *PMS2*. Os genes menores dependem de sua ligação com seus pares para apresentar expressão da proteína. Com isso em tumores que perdem a expressão de MSH2, há uma perda correspondente de MSH6. Similarmente ocorre com a perda de MLH1 e perda concomitante de PMS2. Quando há mutação específica de MSH6 e *PMS2* ocorre perdas de expressão isolada destas proteínas (BOLAND et al. 2008). A perda de expressão da proteína ocorre mais relacionado com a mutação em gene *MSH2* do que no *MLH1*, como observamos nesta casuística, sendo que este fato está relacionado com maior incidência de mutações missense no *MLH1* (PELTOMÄKI 2005). No caso da proteína PMS2 esteve associados a ausência concomitante da

proteína MLH1 em 4 casos em todos eles houve correspondência com achado de mutação em gene *MLH1*. A ausência isolada de PMS2 ocorreu em 4 casos e associado com mutação em gene *MLH1* em 3 deles, um caso de ausência de PMS2 não foi encontrado mutação nos genes de reparo. A ocorrência de perda de expressão de PMS2 isoladamente em mutação para MLH1 é mais rara (HALVARSSON et al. 2006). Em 9 casos houve positividade para todas as proteínas de reparo, indicando ausência de mutação nos genes de reparo. No entanto em 2 pacientes foi detectado mutação em gene de reparo, um com mutação missense em *MSH2* e outro com mutação nonsense de *MLH1*. No primeiro caso, a explicação estaria na menor interferência na estrutura da molécula nas mutações missense e que não interfere na expressão imunohistoquímica. No segundo caso a associação presença de proteína no tumor e mutação nonsense, que determina uma proteína truncada estaria relacionado com tumor sem perda de segundo alelo, com o alelo selvagem funcionando e o tumor não seria relacionado com defeito de reparo, ou então a mutação com proteína truncada, seja numa localização que não afete significativamente os lócus de antigênicos da proteína.

A instabilidade de microssatélites foi estudada em 10 pacientes em somente, por dificuldade de material adequando para o estudo, não tendo sido possível a realização em tecido tumoral parafinado do arquivo, foi realizado somente naqueles que dispunham de material fresco (congelado). Estes pacientes 3 foram considerados estáveis e instáveis em 7 pacientes. Observou-se correspondência de achado de mutações em todos os 7

pacientes com MSI-H sendo 5 correspondentes às mutações em gene *MSH2*, 1 *MLH1* e 1 para *PMS2*.

As mutações patogênicas nos genes estudados foram encontrados em 60,5% dos pacientes para *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, conforme se observa na maioria das casuísticas (KURZAWSKI et al. 2006; SOUSA et al. 2007; OVERBEEK et al. 2007; MARTÍNEZ-BOUZAS et al. 2009). A maioria das mutações foram encontrada nos 2 principais genes representando 25,6% gene *MLH1* (11 mutações) e 25,6% para *MSH2* (11 mutações) na casuística total o que significa 84,6% das mutações encontrada. A maioria das mutações encontradas foram do tipo frameshift e nonsense que determinam um *stop codon* precoce e uma proteína truncada em 65% dos casos. Em 23% a mutação detectada foi do tipo missense em que há a inserção ou deleção pontual em um códon levando a modificação em um único aminoácido na proteína de reparo, por isto necessita de melhor avaliação de definição de patogenicidade, ou seja se o dano na proteína é suficiente para provocar deficiência na sua função. Para mutações previamente estudadas e descritas como patogênicas na literatura foi considerado como patogênico. Das 7 mutações do tipo missense havia correspondência na literatura como patogênica em 5 delas. Nas 2 restantes foram avaliadas através de Poliphen e do Sift que define probabilidade de patogenicidade. Estas 2 mutações *missenses* devem ainda sofrer análise de segregação na família além de testes de funcionalidade da proteína para confirmar a sua patogenicidade.

Na análise de correlação inicialmente com a presença ou não de mutações em qualquer dos 4 genes estudados com os dados demográfico do probando e os relativos ao CCR observou-se relação com localização proximal do CCR em 83,3% versus de localização distal com 33,3% que foi estatisticamente significativa ($p=0,005$) e uma tendência, sem atingir significância estatística, a tumores com menor freqüência de invasão vascular linfática 68,6% contra 20,0% ($p=0,056$) e maior número de tumores malignos 78,9% versus 47,8% ($p=0,057$) em comparação com o grupo sem mutação. Essa tendência ausência de invasão vascular linfática, vai de encontro com o menor risco de comprometimento linfonodal e melhora da sobrevida, que está relacionado com a SL. LLOR et al. (2005) analisando em pacientes HNPCC com critérios de Amsterdam observou diferenças nos pacientes com expressão imunohistoquímica de proteínas de reparo e MSS, normalmente apresentam maior freqüência de tumores distais, menor infiltrado linfocitário tumoral, e menor número de familiares afetados. Em se tratando de grupos de elevada incidência de CCR não houve diferença significativa nos dois grupo para a maioria dos fatores demográficos e patológicos estudados. Tumores de localização proximal é uma das características importantes dos tumores relacionados com a síndrome de Lynch. Trata-se de fator que superou outros que se consideram também importante como a existência de outros tumores associados, idade de aparecimento de tumores e fatores anatomopatológicos. O número de tumores malignos se apresentou marginalmente significativo, com maior número de tumores no grupo com mutação, sendo um indicativo de que o

grupo sem mutação, a síndrome X, apresenta semelhanças com o grupo com mutação.

Considerando os aspectos familiares os fatores relacionados com mutação em genes de reparo foram a ausência de tumor de SNC, 67,6% contra 32,4% com tumor ($p=0,028$) e a densidade de tumor na família (relação de número de tumores na família com número de familiares) quando acima de 0,25 a frequência de mutação foi de 82,4%, contra 46,2% ($p=0,026$). Os tumores de SNC foi um fator negativo para mutação, podendo indicar como causa a existência de mutação em outros genes não relacionados com a SL.

Os tumores de SNC podem estar relacionado com o HNPCC através da Síndrome de Turcot, que representa a associação os tumores de SNC com tumores colorretais. Acredita-se que possa haver relação da síndrome de Turcot tanto com a FAP quanto com HNPCC, porém dados mais recente o relacionam com características hereditárias distintas destas duas síndrome, tendo um padrão de transmissão autossômica recessiva. Uma outra possibilidade é de que a Síndrome X tenha maior relação com os tumores de SNC em relação a SL. Em relação à família o número de tumores relacionados à SL aumentado (maior do que 3) e a ausência de tumores de mama apresentaram uma significância estatística marginal (respectivamente $p=0,085$ e $0,080$). Essa tendência a maior número de tumores como mama e tumores de SNC que se mostraram negativos para mutação nos genes de reparo, provavelmente levaram uma tendência na família a reduzir as chances de detecção de mutação em relação ao número

aumentado de tumores. Em relação aos tumores de mama possivelmente é um indicativo de que não fazem parte da SL, apesar de um número elevado deste tipo de tumores em casuística brasileira a maioria das famílias em que este tipo de tumor estava presente eram famílias sem a detecção de mutação em gene de reparo, possível relação com a síndrome X. Alguns estudos mostram incidência elevada de tumores de mama e próstata nas casuísticas de HNPCC, mas a sua associação é controversa (BOYD et al. 1999; VASEN et al. 2001; FREDRIKSSON et al. 2006). Em relação a pesquisa de expressão da proteína de reparo somente a ausência de expressão da proteína PMS2 apresentou correlação com a mutação em genes de reparo de forma significativa. Além disto a alteração de pelo menos uma das proteínas também apresentou correlação com diferença significativa. As alterações específicas para as proteínas de reparo no estudo imunohistoquímico passam a apresentar significância no estudo específico para mutação em gene MLH1 ou *MSH2* com será visto adiante.

Considerando-se a mutação somente de *MSH2* isoladamente, encontramos correlação estatisticamente significativa com maior frequência de infiltrado linfocitário peritumoral (47,1% contra 13,0%) e $p=0,03$.

Em relação aos dados familiares observamos que a existência de maior frequência de adenomas na família foi um fator negativo para mutação em gene *MSH2* (42,1% contra 12,5% - $p=0,038$), indicando a menor relação com adenomas colorretais para mutação neste gene. O tumor de mama também apresentou na sua presença na família a uma menor chance de detecção de mutação em gene *MSH2* (34,4% versus 0,0%) com significância

estatística ($p=0,041$). Os tumores de mama apresentam uma correlação com a SL ainda controversa, com uma tendência a relação negativa ou baixo em relação aos outros tumores relacionados com a síndrome. Estudo realizado por GEARY et al. (2008), comparando tumores em pacientes com mutação conhecida com controle na população geral mostrou um RR de 1,7 para tumor de mama. Os tumores CCR com característica cribiforme e os tumores sebáceos apresentaram uma significância marginal de mutação para o gene *MSH2* que são fatores encontrados raramente mesmo dentro da SL, porém com tendência a indicar a presença de mutação neste gene.

Considerando a mutação do gene *MLH1* observamos a correlação com tumor de localização cólon proximal no probando, idade de CCR na família em idade mais precoce, abaixo de 50 anos 37,9% versus 0,0% ($p=0,019$) e densidade de tumor na família (relação número de indivíduos com tumor com total de indivíduos na família) com índice acima de 0,25 com maior risco de mutação neste gene (47,1% versus 11,5% - $p=0,014$). Estudo realizado por GOECKE et al. (2007) mostrou um idade inferior para o CCR na mutação para *MLH1* em comparação com *MSH2* (41 versus 44 anos). A idade de CCR no probando e a idade de adenoma também no probando respectivamente menor do que 50 anos (27,0% versus 7,7% $p=0,068$) e 40 anos (75,0% versus 27,7% - $p=0,065$), tiveram significância marginal para mutação em gene *MLH1*. Há uma relação entre os adenomas colorretais na SL e surgimento de CCR, com prevenção de aparecimento de CCR com a remoção dos mesmos e da mesma forma que os tumores apresentam uma maior frequência de localização proximal, e eventualmente lesões

transformadas (MECKLIN et al 2007; KALADY et al. 2010). Em relação às proteínas de reparo observou-se associação com a presença de proteínas MSH2 e MSH6 e para ausência de PMS2. Em relação à ausência de MLH1 apresentou significância marginal. Os achados são coerentes com o esperado para as mutações nos genes *MLH1*

CONCLUSÃO

6 CONCLUSÃO

O índice de detecção de mutação em genes de reparo neste grupo selecionado para os 4 genes mais importantes através da técnica de seqüenciamento foi de 60,5%. Os tumores proximais em cólon, densidade de tumores na família e a ausência de tumores de SNC apresentaram correlação com os pacientes portadores de mutação em genes de reparo. Para os pacientes com mutação em MLH1 encontramos os tumores de localização proximal, idade precoce em familiares para CCR e densidade de tumor nas famílias apresentaram correlação positiva enquanto que para o gene MSH2 houve correlação com significância estatística para infiltrado linfocitário peritumoral e uma correlação negativa para presença de adenoma e presença de tumores de mama na família.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. **N Engl J Med** 1998; 338:1481-7.

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

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.

Alberts F, Bray D, Johnson A, et al. **Fundamentos da biologia celular**. Porto Alegre: Artmed; 1999. Replicação do NA, reparo e recombinação: os elementos genéticos móveis podem mover-se por meio de mecanismos transposicionais ou conservativos; p.286-9.

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.

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

Barrow E, Robinson L, Alduaij W, et al. Cumulative lifetime incidence of extracolonic cancers in Lynch syndrome: a report of 121 families with proven mutations. **Clin Gen** 2009; 75:141-9.

Baudhuin LM, Burgart LJ, Leontovich O, et al SN. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. **Fam Cancer** 2005; 4:255-65.

Bellolio R F, Alvarez V K, De la Fuente L M, et al. Hereditary colorectal cancer: Molecular analysis of APC and MLH1 genes. **Rev Med Chil** 2006; 134:841-8.

Bennett MW, O'Connell J, O'Sullivan GC, et al. The Fas counterattack in vivo: apoptotic depletion of tumor-infiltrating lymphocytes associated with Fas ligand expression by human esophageal carcinoma. **J Immunol** 1998; 160:5669-75.

Bessa X, Ballesté B, Andreu M, et al. A prospective, multicenter, population-based study of BRAF mutational analysis for Lynch syndrome screening. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2008; 6:206-14.

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

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

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, 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.

Botma A, Nagengast FM, Braem MG, et al. Body mass index increases risk of colorectal adenomas in men with Lynch syndrome: the GEOLynch cohort study. **J Clin Oncol** 2010; 28:4346-53.

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

Brand RM, Jones DD, Lynch HT, et al. Risk of colon cancer in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients as predicted by fuzzy modeling: Influence of smoking. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4485-91.

Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue *hMLH1* is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. **Nature** 1994; 368:258-61.

Buckowitz A, Knaebel H-P, Benner A, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer is associated with local lymphocyte infiltration and low frequency of distant metastases. **Br J Cancer** 2005; 92:1746-53.

Cai SJ, Xu Y, Cai GX, et al. Clinical characteristics and diagnosis of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **World J Gastroenterol** 2003; 9:284-7.

Cao Y, Pieretti M, Marshall J, et al. Challenge in the differentiation between attenuated familial adenomatous polyposis and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: case report with review of the literature. **Am J Gastroenterol** 2002; 97:1822-7.

Carethers JM. Chemotherapeutic implications in microsatellite unstable colorectal cancer. Jo WS, **Cancer Biomark** 2006; 2:51-60.

Chen CS, Loweinstein L, James C, et al. Muir-Torre syndrome and early detection of internal malignancy. **Med J Aust** 2003; 178:368.

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 Med Genet** 2006; 20:7:5.

Clark AB, Cook ME, Tran HT, et al. Functional analysis of human MutSalpha and MutSbeta complexes in yeast. **Nucleic Acids Res** 1999; 27:736-42.

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

Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. **Cancer Res** 1998; 58:3455-60.

Cunningham JM, Kim CY, Christensen ER, et al. The frequency of hereditary defective mismatch repair in a prospective series of unselected colorectal carcinomas. **Am J Hum Genet** 2001; 69:780-90.

da Silva FCC, Dominguez MV, Ferreira FO, et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **São Paulo Med J** 2009; 127:46-51.

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

de Jong AE, Morreau H, van Puijenbroek M, et al. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. **Gastroenterology** 2004; 126:42-8.

de Jong AE, Nagengast FM, Kleibeuker JH, et al. What is the appropriate screening protocol in Lynch syndrome? **Fam Cancer** 2006a; 5:373-8.

de Jong AE, Hendriks YM, Kleibeuker JH, et al. Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. **Gastroenterology** 2006b; 130:665-71.

Devlin LA, Graham CA, Price JH, Morrison PJ. Germline MSH6 mutations are more prevalent in endometrial cancer patient cohorts than hereditary non polyposis colorectal cancer cohorts. **Ulster Med J** 2008; 77:25-30.

Diergaarde B, Braam H, Vasen HF, et al. Environmental factors and colorectal tumor risk in individuals with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Clin Gastroenterol Hepatol** 2007; 5:736-42.

Drescher KM, Sharma P, Watson P, et al. Lymphocyte recruitment in to the tumor site is altered in patients with MSI-H colon cancer. **Fam Cancer** 2009; 8: 231-9.

Drescher KM, Sharma P, Lynch HT. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch Syndrome patients. **Clin Dev Immunol** 2010; 2010:170432.

Dolcetti R, Viel A, Doglioni C, et al. High prevalence of activated intraepithelial cytotoxic T lymphocytes and increased neoplastic cell apoptosis in colorectal carcinomas with microsatellite instability. **Am J Path** 1999; 154:1805-13.

Dove-Edwin I, Sasieni P, Adams J, Thomas HJ. Prevention of colorectal cancer by colonoscopic surveillance in individuals with a family history of colorectal cancer: 16 year, prospective, follow-up study. **Nat Clin Pract Oncol** 2006a; 3:362-3.

Dove-Edwin I, de Jong AE, Adams J, et al. Prospective results of surveillance colonoscopy in dominant familial colorectal cancer with and without Lynch syndrome. **Gastroenterology** 2006b; 130:1995-2000.

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

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

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

Elsakov P, Kurtinaitis J. Survival from colorectal carcinoma in HNPCC families as compared to the general population in Lithuania--initial results. **Fam Cancer** 2006; 5:369-71.

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

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

Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog *MSH2* and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell** 1993; 75:1027-38.

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

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

Fisk B, Anderson BW, Gravitt KR, et al. Identification of naturally processed human ovarian peptides recognized by tumor-associated CD8+ cytotoxic T lymphocytes," **Cancer Res** 1997; 57:87-93.

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

Fredriksson H, Ikonen T, Autio V, et al. Identification of germline MLH1 - alterations in familial prostate cancer. **Eur J Cancer** 2006; 42:2802-6.

Frei JV. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II): diploid malignancies with prolonged survival. **Cancer** 1992; 69:1108-11.

Geary J, Sasieni P, Houlston R, et al. Gene-related cancer spectrum in families with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). **Fam Cancer** 2008; 7:163-72.

Giraldo A, Gómez A, Salguero G, et al. MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)--description of four novel mutations. **Fam Cancer** 2005; 4:285-90.

Giuffrè G, Müller A, Brodegger T, et al. Microsatellite analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer associated colorectal adenomas by laser-assisted microdissection: correlation with mismatch repair protein expression provides new insights in early steps of tumorigenesis. **J Mol Diag** 2005; 7:160-70.

Globocan. International Agency for Research on Cancer. Available from: <URL:<http://globocan.iarc.fr>>. [2010 out 11].

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

Gradia S, Subramanian D, Wilson T, et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. **Mol Cell** 1999; 3:255-61.

Grindedal EM, Møller P, Eeles R, et al. Germ-line mutations in mismatch repair genes associated with prostate cancer. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2009; 18:2460-7.

Halvarsson B, Lindblom A, Johansson L, et al. Loss of mismatch repair protein immunostaining in colorectal adenomas from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Mod Pathology** 2005; 18:1095-101.

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

Hemminki A, Peltomaki P, Mecklin JP, et al. Loss of the wild type *MLH1* gene is a feature of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nat Genet** 1994; 8:405- 410.

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

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

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** 2006b; 56:213-25.

Hirata K, Kanemitsu S, Nakayama Y, et al. A novel germline mutation of MSH2 in a hereditary nonpolyposis colorectal cancer patient with liposarcoma. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:193-6.

Hurlstone DP, Karajeh M, Cross SS, et al. The role of high-magnification-chromoscopic colonoscopy in hereditary nonpolyposis colorectal cancer screening: a prospective "back-to-back" endoscopic study. **Am J Gastroenterol** 2005; 100:2167-73.

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

Iino H, Simms L, Young J, et al. DNA microsatellite instability and mismatch repair protein loss in adenomas presenting in hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Gut** 2000; 47:37-42.

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

Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature** 1993;363:558-61.

Jackson CC, Holter S, Pollett A, et al. Café-au-lait macules and pediatric malignancy caused by biallelic mutations in the DNA mismatch repair (MMR) gene PMS2. **Pediatr Blood Cancer** 2008; 50:1268-70.

Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Anticancer Res** 1994; 14:1631-4.

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

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

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

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

Kalady MF, McGannon E, Vogel JD, et al. Risk of colorectal adenoma and carcinoma after colectomy for colorectal cancer in patients meeting Amsterdam criteria. **Ann Surg** 2010; 252:507-11.

Kaplan EL, Meier P. Non parametric estimation from incomplete observations. **J Am Stat Assoc** 1958; 53:4458-81.

Kouri M, Laasonen A, Mecklin J-P, et al. Diploid predominance in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma evaluated by flow cytometry. **Cancer** 1990; 65:1825-9.

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

Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. Germline MSH6 mutations in colorectal cancer families. **Cancer Res** 1999; 59: 5068-74.

Krüger S, Kinzel M, Walldorf C, et al. Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. **Eur J Hum Genet** 2008; 16:62-72.

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, et al. Epigenetic phenotypes distinguish microsatellite-stable and -unstable colorectal cancers. **Proc Natl Acad Sci USA** 1999; 96:12661-6.

Kuismanen SA, Holmberg MT, Salovaara R, et al. Genetic and epigenetic modification of MLH1 accounts for a major share of microsatellite-unstable colorectal cancers. **Am J Pathol** 2000; 156:1773-9.

Kurzawski G, Suchy J, Lener M, et al. Germline MSH2 and MLH1 mutational spectrum including large rearrangements in HNPCC families from Poland (update study). **Clin Genet** 2006; 69:40-7.

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

Lamberti C, Kruse R, Ruelfs C, et al. Microsatellite instability: a useful diagnostic tool to select patients at high risk for hereditary non-polyposis colorectal cancer: a study in different groups of patients with colorectal cancer. **Gut** 1999; 44:839-43.

Lanspa SJ, Jenkins JX, Cavalieri RJ, et al. Surveillance in Lynch syndrome: how aggressive? **Am J Gastroenterol** 1994; 89:1978-80.

Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N et al. Mutations of a *mutS* homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Cell** 1993; 75:1215-25.

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

Lindor NM, Petersen GM, Hadley DW, et al. Recommendations for the care of individuals with an inherited predisposition to Lynch syndrome: a systematic review. **JAMA** 2006; 296:1507-17.

Lindblom A, Tannergård 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 B, Parsons RE, Hamilton SR, et al. hMSH2 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. **Cancer Res** 1994; 54:4590-4.

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

Llor X, Pons E, Xicola RM, et al. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam criteria without involvement of the mutator pathway. **Clin Cancer Res** 2005; 11:7304-10.

Loughrey MB, Waring PM, Tan A, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Fam Cancer** 2007; 6:301-10.

Lugli A, Zlobec I, Baker K, et al. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. **J Clin Pathol** 2007; 60:534-9.

Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. **Cancer** 1995; 76:2427-33.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). An updated review. **Cancer** 1996; 78:1149-67.

Lynch HT, Watson P, Shaw TG, et al. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part II: Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma as a model. **Cancer** 1999; 86:2457-63.

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

Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. **N Engl J Med** 2003; 348:919-32.

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

Martínez-Bouzas C, Beristain E, Ojembarrena E, et al. A study on MSH2 and MLH1 mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from the Basque Country, describing four new germline mutations. **Fam Cancer** 2009; 8:533-9.

Maul JS, Warner NR, Kuwada SK, et al. Extracolonic cancers associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the Utah Population Database. **Am J Gastroenterol** 2006; 101:1591-6.

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

Mecklin JP, Aarnio M, Läärä E, et al. Development of colorectal tumors in colonoscopic surveillance in Lynch syndrome. **Gastroenterology** 2007; 133:1093-8.

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

Meijer TW, Hoogerbrugge N, Nagengast FM, et al. In Lynch syndrome adenomas, loss of mismatch repair proteins is related to an enhanced lymphocytic response. **Histopathology** 2009; 55:414-22.

[MMR] Mismatch Repair Genes Variant Database. **Data base**. Available from: <URL:<http://www.med.mun.ca/mmrvariants>> [2009 jul 8]

Müller A, Schackert HK, Lange B, et al. A novel MSH2 germline mutation in homozygous state in two brothers with colorectal cancers diagnosed at the age of 11 and 12 years. **Am J Med Genet A** 2006a; 140:195-9.

Müller A, Beckmann C, Westphal G, et al. Prevalence of the mismatch-repair-deficient phenotype in colonic adenomas arising in HNPCC patients: results of a 5-year follow-up study. German HNPCC Consortium. **Int J Colorectal Dis** 2006b; 21:632-41.

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

Ollikainen M, Hannelius U, Lindgren CM, et al. Mechanisms of inactivation of MLH1 in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma: a novel approach. **Oncogene** 2007; 26:4541-9.

Okada K, Komuta K, Hashimoto S, et al. Frequency of apoptosis of tumor infiltrating lymphocytes induced by Fas counterattack in human colorectal carcinoma and its correlation with prognosis. **Clin Cancer Res** 2000; 6:3560-4.

Okano K, Maeba T, Moroguchi A, et al. Lymphocytic infiltration surrounding liver metastases from colorectal cancer. **J Surg Oncol** 2003; 82:28-33.

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.

Overbeek LI, Kets CM, Hebeda KM, et al. Patients with an unexplained microsatellite instable tumour have a low risk of familial cancer. **Br J Cancer** 2007; 96:1605-12.

Pande M, Lynch PM, Hopper JL, et al. Smoking and colorectal cancer in Lynch syndrome: results from the Colon Cancer Family Registry and the University of Texas M.D. Anderson Cancer Center. **Clin Cancer Res** 2010; 16:1331-9.

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.

Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF et al. Mutation of a *mutL* homolog in hereditary colon cancer. **Science** 1994; 263:1625-9.

Park YJ, Shin KH, Park JG. Risk of gastric cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer in Korea. **Clin Cancer Res** 2000; 6:2994-8.

Parsons R, Li GM, Longley M, Modrich P, et al. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. **Science** 1995; 268:738-40.

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

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

Pineda M, Castellsagué E, Musulén E, et al. Non-Hodgkin lymphoma related to hereditary nonpolyposis colorectal cancer in a patient with a novel heterozygous complex deletion in the MSH2 gene. **Genes Chromosomes Cancer** 2008; 47:326-32.

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

Poley JW, Wagner A, Hoogmans MM, et al. Biallelic germline mutations of mismatch-repair genes: a possible cause for multiple pediatric malignancies. **Cancer** 2007; 109:2349-56.

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

Rhyu MS. Molecular mechanisms underlying hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma **J Natl Cancer Inst** 1996; 88:240-51.

Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, et al. Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. **N Engl J Med** 2003; 17:247-57.

Rijcken FE, Hollema H, Kleibeuker JH. Proximal adenomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer are prone to rapid malignant transformation. **Gut** 2002; 50:382-6.

Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome:

meeting highlights and Bethesda guidelines. **J Natl Cancer Inst** 1997; 89:1758-62.

Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Ann Surg Oncol** 2002; 6:555-61.

Sakurai BM, Silva AMS. Resultados de tratamento de câncer de cólon. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. **Câncer de cólon, reto e ânus**. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.255-61.

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

Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al. Population based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **J Clin Oncol** 2000; 18:2193-200.

Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, et al. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. **Gastroenterology** 2001; 121:830-8.

Sanger F. Determination of nucleotide sequences in DNA. **Science** 1981; 214:1205-10.

Sankila R, Aaltonen LA, Järvinen HJ, et al. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. **Gastroenterology** 1996; 110:682-7.

Sarroca C, Della Valle A, Fresco R, et al. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among Uruguayan patients with colorectal cancer. **Clin Genet** 2005; 68:80-7.

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

Shimodaira H, Filosi N, Shibata H, et al. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. **Nat Genet** 1998; 19:384-9.

Schmeler KM, Daniels MS, Soliman PT, et al. Primary peritoneal cancer after bilateral salpingo-oophorectomy in two patients with Lynch syndrome. **Obstet Gynecol** 2010; 115:432-4.

Smyrk TC, Watson P, Kaul K, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes are a marker for microsatellite instability in colorectal carcinoma. **Cancer** 2001; 91:2417-22.

Sousa R, Lage P, Ferreira S, et al. Need of new clinical criteria for the identification of genetic Lynch syndrome. **Acta Med Port** 2007; 20:535-42.

Stulp RP, Vos YJ, Mol B, et al. First report of a de novo germline mutation in the MLH1 gene. **World J Gastroenterol** 2006; 12:809-11.

ten Kate GL, Kleibeuker JH, Nagengast FM, et al. Is surveillance of the small bowel indicated for Lynch syndrome families? **Gut** 2007; 56:1198-201.

Thibodeau SN, French AJ, Roche PC, et al. Altered expression of *hMSH2* and *hMLH1* in tumors with microsatellite instability and genetic alterations in mismatch repair genes. **Cancer Res** 1996; 56:4836-40.

Thibodeau SN, French AJ, Cunningham JM, et al. Microsatellite instability in colorectal cancer: different mutator phenotypes and the principal involvement of *hMLH1*. **Cancer Res** 1998; 58:1713-8.

Umar A, Risinger JI, Hawk ET, et al. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:153-8.

Urso E, Pucciarelli S, Agostini M, et al. Proximal colon cancer in patients aged 51-60 years of age should be tested for microsatellites instability: a comment on the Revised Bethesda Guidelines. **Int J Colorectal Dis** 2008; 23:801-6.

van der Post RS, Kiemeny LA, Ligtenberg MJ, et al. Risk of urothelial bladder cancer in Lynch syndrome is increased, in particular among MSH2 mutation carriers. **J Med Genet** 2010; 47:464-70.

Vaccaro CA, Bonadeo F, Roverano AV, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) in Argentina: report from a referral hospital register. **Dis Colon Rectum** 2007; 50:1604-11.

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

Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, et al. 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 HFA, Morreau H, Nortier JWR. Is breast cancer part of the tumor spectrum of hereditary nonpolyposis colorectal cancer? **Am J Hum Gen** 2001; 68:1533-5.

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

Walsh MD, Buchanan DD, Cummings MC, et al. Lynch syndrome-associated breast cancers: clinicopathologic characteristics of a case series from the colon cancer family registry. **Clin Cancer Res** 2010; 16:2214-24.

Wang XL, Yuan Y, Zhang SZ, et al. Clinical and genetic characteristics of Chinese hereditary nonpolyposis colorectal cancer families. **World J Gastroenterol** 2006; 12:4074-7.

Watanabe T, Muto T, Sawada T, et al. Flat adenoma as a precursor of colorectal carcinoma in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. **Cancer** 1996; 77:627-34.

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

Watson P, Vasen HF, Mecklin JP, et al. The risk of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Am J Med** 1994; 96:516-20.

Watson P, Lin KM, Rodriguez-Bigas MA, et al. Colorectal carcinoma survival among hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma family members. **Cancer** 1998; 83: 259-66.

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

Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, et al. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. **N Engl J Med** 1998; 339:511-8.

Winawer SJ, Zauber AG, O'Brien, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps. The National Polyp Study Workgroup. **N Engl J Med** 1993; 328:901-6.

You JF, Hsieh LL, Changchien CR, et al. Inverse effects of mucin on survival of matched hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic colorectal cancer patients. **Clin Cancer Res.** 2006; 12:4244-50.

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.

Zhang YZ, Sheng JQ, Li SR, et al. Clinical phenotype and prevalence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome in Chinese population. **World J Gastroenterol** 2005; 11:1481-8.

ANEXO

Anexo 1 – História familiar e resultado de mutação

Avaliação da Frequência de Mutações nos Genes do Sistema de Reparo de DNA em Pacientes com Suspeita de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose:

Iniciais do probando: RGH:

Número de registro no estudo:

Centro:

Tumor(es) do probando: Idade de diagnóstico:

Classificação da história familiar

1 () HNPCC – Critério de Amsterdam I

2 () Critério de Amsterdam II

3 () Critério Bethesda

Se critérios de Bethesda preenchido, determinar qual(is) o(s) critério(s) utilizado(s):

1 () Câncer colorretal diagnosticado em um paciente com menos de 50 anos de idade.

2 () Presença de tumor colorretal sincrônico, metacrônico, ou tumores associados ao HNPCC (tumor de endométrio, estômago, ovário, pâncreas, ureter, pelve renal, trato biliar, cérebro, adenoma de glândula sebácea, keratocantomas, tumor intestino delgado) independente da idade

3 () Câncer colorretal com histologia MSI-H (tumor com infiltrado linfocitário, reação linfocítica Crohn-like, diferenciação anel de sinete/mucínica, crescimento de padrão medular) em indivíduo com menos de 60 anos

4 () Câncer colorretal diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com tumor associado ao HNPCC, com um dos tumores diagnosticados antes dos 50 anos

5 () Câncer colorretal diagnosticado em dois ou mais parentes de primeiro ou segundo graus com tumores associados ao HNPCC, independente da idade

História familiar

	Geração					
	I	II	III	IV	VI	Total
Indivíduos						
Indivíduos investigados						
Idv não afetados						

Tumores	Geração								
	I		II		III		IV		Total
	N	Idade média	N	Idade média	N	Idade média	N	Idade média	
CCR									
Ca endométrio									
Ca estômago									
Ca ovário									
Ca pâncreas									
Ca ureter									
Ca pelve renal									
Ca trato biliar									
Tu SNC									
Tu intestino delgado									
Keratocantomas									
Adenoma glândula sebácea									
Ca mama									
Ca próstata									
Outros tumores									

Análise de Microsatélites

BAT-25	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
BAT-26	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
MONO-29	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
NR-21	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
NR	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
Penta C	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado
Penta D	0 () estável	1 () instável	9 () ign/não realizado

Imunohistoquímica

hMSH2	0 () com expressão	1 () sem expressão	9 () ign/não realizado
hMLH1	0 () com expressão	1 () sem expressão	9 () ign/não realizado

Seqüenciamento

hMSH2	0 () normal	1 () polimorfismo	2 () mutação	9 () ign/não realizado
hMLH1	0 () normal	1 () polimorfismo	2 () mutação	9 () ign/não realizado

Tipo de mutação :

Descrição da mutação: