

# **Caracterização clínica, molecular e genética de pacientes com câncer colorretal abaixo de 50 anos**

**Sara Iolanda Oliveira da Silva**

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente  
para obtenção do título de Doutora em Ciências  
Área de concentração: Oncologia**

**Orientador: Dra. Giovana Tardin Torrezan**

**Co-orientador: Dirce Maria Carraro**

**São Paulo**

**2022**

## Ficha catalográfica

**Silva, Sara .**

**Caracterização clínica, molecular e genética de pacientes com câncer colorretal abaixo de 50 anos. / Sara Silva. São Paulo, 2022.**

**118f.**

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

**Orientador: Giovana Tardin Torrezan.**

**1. Síndrome de Lynch, 2. Câncer colorretal hereditário, 3. Teste genético**

**CDU 616**

\*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

**Nome:** SARA IOLANDA OLIVEIRA DA SILVA

**Título:** Caracterização clínica, molecular e genética de pacientes com câncer colorretal abaixo de 50 anos

Aprovado em: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**Banca Examinadora**

**Orientador:** Giovana Tardin Torrezan

**Instituição:** Fundação Antônio Prudente

**Membro da banca:** Dr. Benedito Mauro Rossi

**Instituição:** Hospital Sírio Libanes

**Membro da banca:** Dr. Diogo Cordeiro de Queiroz Soares

**Instituição:** Fundação Antônio Prudente

**Membro da banca:** Dr. Edenir Inez Palmero

**Instituição:** INCA - National Cancer Institute

**Membro da banca:** Dra. Paula Fontes Asprino

**Instituição:** Instituto de Ensino e Pesquisa (IEP)

## **Suporte à pesquisa por agência de fomento**

Este trabalho recebeu apoio da FAP, através de auxílio à Pesquisa - INCT 2014: de Oncogenômica e Inovação Terapêutica - FAPESP 2014/509443-1 e CNPq 465682/2014, Bolsa CAPES de doutorado ( 88882.366024/2019-01 (Migrado - SACPAIS).

*“Você não pode esperar construir um mundo melhor sem melhorar os indivíduos. Para esse fim, cada um de nós deve trabalhar para o seu próprio aperfeiçoamento e, ao mesmo tempo, compartilhar uma responsabilidade geral por toda a humanidade”.*

*MARIE CURIE.*

## **DEDICATÓRIA**

Aos meus pais (Francisca e Ivaldo) e meu irmão (Erick), por serem sempre apoiadores do meu crescimento pessoal e profissional.

## **AGRADECIMENTOS**

**Agradeço primeiramente e especialmente a todos os pacientes que aceitaram participar deste estudo**, compartilhando momentos tão difíceis de suas histórias para que este trabalho fosse realizado. Sem vocês nada disso seria possível.

**À minha querida orientadora Dra. Giovana Torrezan**, um ser humano maravilhoso que eu tive a sorte e o prazer de tê-la como orientadora, obrigada pela confiança neste trabalho, paciência, orientações, ensinamentos e muitas vezes pelo ombro amigo.

**À minha co-orientadora Dra. Dirce Maria Carraro**, pela oportunidade de poder fazer parte do grupo LGBM e por todos ensinamentos.

**À minha família, meus pais e meu irmão**, por todo apoio, confiança, paciência e compreensão. Sem vocês nada disso seria possível. Vocês foram e sempre serão meus maiores inspiradores.

**Ao Dr. Samuel Aguiar e a todo o Núcleo de Tumores colorretais, a enfermeira de Pesquisa Bruna Catin Kupper, a Dra. Tabata Alves e ao departamento de Anatomia, ao Dr Diogo Soares e Dra Daniele Pereira e ao departamento de Oncogenética**, pelo apoio e auxílio no desenvolvimento deste trabalho.

**Ao Dr. Benedito Rossi e a Dra. Maria Nirvana Formiga**, pelo apoio e suas valiosas contribuições no desenvolvimento deste trabalho como banca de acompanhamento.

**À equipe do Biobanco**, por todo auxílio e processamento das amostras. Aos funcionários da pós-graduação, do CIPE e da biblioteca, por toda atenção e disponibilidade quando precisei.

**Às minhas colegas de laboratório que se tornaram grandes amigas de vida, Nathália de Angelis, Ana Araujo, Ana Kerekes, Isabela Tanus, Debora Andrade, Julia Salles, Dayane Schmidt e Emne Abdallah**, por todo apoio, paciência, companheirismo, ajuda, vocês tornaram essa caminhada mais leve, o apoio emocional de vocês e incentivo foram essenciais em todas as etapas deste trabalho.

**A Nathália de Angelis** em especial, pela amizade, parceria, amor, suporte e apoio, uma irmã que a vida me deu de presente e que se tornou, e é basilar em minha vida.

**A todos meus colegas e amigos do Laboratório de Genômica e Biologia Molecular e do Laboratório de Diagnóstico Genômico**, por todos aprendizados e parcerias.

**Por fim agradeço a CAPES, CNPq e FAPESP**, pelo fomento financeiro e incentivo à pesquisa.

## RESUMO

Silva, SIO. **Caracterização clínica, molecular e genética de pacientes com câncer colorretal abaixo de 50 anos.** [TESE]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2022.

**Introdução:** Pacientes com câncer colorretal (CCR) em idade jovem (< 50 anos) apresentam maior risco de apresentar variantes germinativas em genes de predisposição ao câncer, entre eles os genes da Síndrome de Lynch (SL) (genes MMR - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*). Detectar a perda de expressão de proteínas de reparo de incompatibilidade de DNA (MMR) é altamente relevante para identificar pacientes com síndrome de Lynch. No entanto, a inativação de *MLH1* devido à hipermetilação do promotor ocorre em 15% dos cânceres colorretais (CCRs) esporádicos e está correlacionada com mutações somáticas *BRAF*. Ainda, apesar das principais síndromes hereditárias de CCR representarem 15-19% dos casos de CCR de início precoce, a etiologia da maior parte dos CCRs nestes pacientes é desconhecida, mesmo com até 25% destes casos apresentando história familiar importante para essa neoplasia. **Objetivo:** Caracterizar o fenótipo clínico e molecular (somático e germinativo) de pacientes com CCR desenvolvido antes dos 50 anos tratados no A.C. Camargo Cancer Center. **Materiais e Métodos:** Pacientes com câncer colorretal <50 anos foram selecionados a partir do banco de dados do Departamento de Cirurgia Pélvica ou pelo encaminhamento do Departamento de Oncogenética. A análise de metilação do promotor de *MLH1* foi realizada por sequenciamento de nova geração (NGS) a partir de DNA convertido por bissulfato de sódio, em uma metodologia desenvolvida e validada nesse estudo. A análise de mutação de *BRAF* foi realizada por NGS de *amplicon*. Para um subgrupo de pacientes com critérios clínicos e moleculares específicos (tumores MMR deficientes, história familiar positiva para CCR, mutação *KRAS*: G12C e/ou idade <40 anos) foi realizado o sequenciamento germinativo de genes de predisposição ao CCR. Na avaliação das variantes germinativas foi utilizado um painel multigênico com 62 genes de associação conhecida, emergente ou desconhecida para predisposição ao CCR. As variantes identificadas foram classificadas segundo os critérios sugeridos pelo *American College of Medical Genetics (ACMG)*. **Resultados:** Para análise de metilação de *MLH1* utilizamos DNA de tumores FFPE e saliva foi tratado com bissulfato, amplificado por PCR e avaliado por NGS. Em tumores deficientes em *MLH1/PMS2*, o estado de metilação de *MLH1* foi concordante com o estado de mutação *BRAF* em 90% (18/20) dos

casos. Nosso teste NGS baseado em amplicon mostrou uma grande sensibilidade e especificidade para detectar a metilação de *MLH1* em amostras de CCR, com alta concordância com a avaliação da mutação *BRAF*. A avaliação das variantes germinativas foi realizada em 89 pacientes, e identificamos 24 (27%) pacientes com variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (P/PP). A maioria dos pacientes 53% (47/89) apresentaram variantes de significado incerto (VUS) e 18 (20%) pacientes apresentaram apenas variantes sem significado clínico para os 62 genes avaliados. Dos 24 pacientes com variantes patogênicas, 16 (66,6%) apresentaram variantes P/PP em genes da síndrome de Lynch. Cinco pacientes (20%) apresentaram variantes P/PP em *MUTYH* (3 bialélicos e 2 monoalélicos). Dois (8,3%) pacientes tinham variantes PP em *FAN1*. Um paciente apresentou uma variante PP em *NTHL1* (monoalélica), e para os genes *XRCC4* e *RAD51C* tivemos um paciente cada com alteração. Dois pacientes apresentaram variantes P/PP em mais de 1 gene (1 *MLH1* com *FAN1*, 1 *MUTYH* com *XRCC4*). **Conclusão:** Em nosso trabalho fomos capazes de desenvolver com sucesso uma metodologia baseada em NGS para avaliação de metilação no promotor do gene *MLH1*, para caracterizar molecularmente as amostras tumorais do grupo de pacientes com deficiência nos genes de reparo relacionados a causas esporádicas (metilação de *MLH1* e mutação de *BRAF*). Além disso, identificamos variantes germinativas com evidência definitiva de predisposição ao CCR em 1 a cada 4 pacientes da nossa coorte, além de termos identificado variantes patogênicas em genes com evidência limitada ou ausente de predisposição hereditária ao câncer CCR, como é o caso dos genes *RAD51C*, *XRCC4* e *FAN1*.

**Descritores:** Síndrome de Lynch, câncer colorretal hereditário, teste genético.

## ABSTRACT

**Silva, SIO. Clinical, molecular and genetic characterization of colorectal cancer patients under 50 years of age. [THESIS].** São Paulo: Antônio Prudente Foundation; 2022

**Introduction:** Patients with colorectal cancer (CRC) at a young age (< 50 years) are at greater risk of having germline variants in cancer predisposition genes, including Lynch Syndrome (LS) genes (MMR genes - *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*). Detecting the loss of expression of DNA mismatch repair (MMR) proteins is highly relevant to identify patients with Lynch syndrome. However, inactivation of *MLH1* due to promoter hypermethylation occurs in 15% of sporadic colorectal cancers (CRCs) and is correlated with somatic *BRAF* mutations. Also, although the main hereditary syndromes of CRC represent 15-19% of cases of early-onset CRC, the etiology of most CRCs in these patients is unknown, even with up to 25% of these cases presenting an important family history of this neoplasm. **Objective:** To characterize the clinical and molecular phenotype (somatic and germline) of patients with CRC developed before the age of 50 years treated at the A.C.Camargo Cancer Center. **Materials and Methods:** Colorectal cancer patients <50 years were selected from the database of the Department of Pelvic Surgery or by referral from the Department of Oncogenetics. *MLH1* promoter methylation analysis was performed by next-generation sequencing (NGS) from DNA converted by sodium bisulfite, in a methodology developed and validated in this study. *BRAF* mutation analysis was performed by amplicon NGS. For a subgroup of patients with specific clinical and molecular criteria (MMR deficient tumors, positive family history for CCR, *KRAS*:G12C mutation, and/or age <40 years) germline sequencing of CRC predisposing genes was performed. In the evaluation of germline variants, a multigene panel with 62 genes of known, emerging or unknown association for CRC predisposition was used. The identified variants were classified according to the criteria suggested by the American College of Medical Genetics (ACMG). **Results:** For *MLH1* methylation analysis we used DNA from FFPE tumors and saliva was treated with bisulfite, amplified by PCR and evaluated by NGS. In *MLH1*/*PMS2* deficient tumors, *MLH1* methylation status was concordant with *BRAF* mutation status in 90% (18/20) of cases. Our amplicon-based NGS test showed great sensitivity and specificity for detecting *MLH1* methylation in CRC samples, with high agreement with the *BRAF* mutation assessment. The evaluation of germline variants was performed in 89 patients, and we identified 24 (27%) patients with pathogenic or probably pathogenic (P/PP) variants. Most patients 53% (47/89) had variants of uncertain significance (VUS) and 18 (20%) patients had only variants without clinical

significance for the 62 genes evaluated. Of the 24 patients with pathogenic variants, 16 (66.6%) had P/PP variants in Lynch syndrome genes. Five patients (20%) had P/PP variants in *MUTYH* (3 biallelic and 2 monoallelic). Two (8.3%) patients had PP variants in *FAN1*. One patient had a PP variant in *NTHL1* (monoallelic), and for the *XRCC4* and *RAD51C* genes we had one patient each with alteration. Two patients had P/PP variants in more than 1 gene (1 *MLH1* with *FAN1*, 1 *MUTYH* with *XRCC4*).

**Conclusion:** In our work, we were able to successfully develop a methodology based on NGS for the evaluation of methylation in the promoter of the *MLH1* gene, to molecularly characterize the tumor samples from the group of patients with deficiency in the repair genes related to sporadic causes (*MLH1* methylation and *BRAF* mutation). In addition, we identified germline variants with definitive evidence of predisposition to CRC in 1 out of 4 patients in our cohort, in addition to having identified pathogenic variants in genes with limited or no evidence of hereditary predisposition to CRC cancer, such as the *RAD51C* genes, *XRCC4* and *FAN1*.

Descriptors: Lynch syndrome, hereditary colorectal cancer, genetic testing.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Incidência e mortalidade de câncer no mundo.....	19
<b>Figura 2</b>	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no ano de 2020 por sexo.....	20
<b>Figura 3</b>	Vias de carcinogênese colorretal. A ativação da via Wnt (principalmente via mutação em <i>APC</i> ) ou mutação em <i>BRAF</i> pode iniciar a tumorigênese colorretal.....	30
<b>Figura 4</b>	Esquema representativo do delineamento experimental do projeto.....	34
<b>Figura 5</b>	Painel customizado com 62 genes de predisposição ao câncer.....	43
<b>Figura 6</b>	Região promotora de <i>MLH1</i> e CpGs avaliados.....	49
<b>Figura 7</b>	Análise de metilação de <i>MLH1</i> em amostras de saliva e tumor.....	51
<b>Figura 8</b>	Porcentagem de variantes encontradas em 89 paciente que fizeram sequenciamento de painel germinativo multi-gênico.....	56
<b>Figura 9</b>	Porcentagem das variantes patogênicas encontradas em 24 pacientes.....	57
<b>Figura 10</b>	Deleção dos éxons 17-19 <i>MLH1</i> no paciente ID_24.....	70

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1</b>	Concentrações padronizadas da PCR para análise de metilação no gene <i>MLH1</i> .....	36
<b>TABELA 2</b>	Protocolo de ciclagem da PCR para análise de metilação no gene <i>MLH1</i> .....	36
<b>TABELA 3</b>	Detalhamento do Protocolo para análise de mutação no gene <i>BRAF</i> .....	38
<b>TABELA 4</b>	Protocolo de ciclagem da PCR para análise de mutação no gene <i>BRAF</i> .....	38
<b>TABELA 5</b>	Diluição seriada e análise de reprodutibilidade.....	48
<b>TABELA 6</b>	Análise da metilação do promotor <i>MLH1</i> e mutação <i>BRAF V600E</i> em tumores com perda <i>MLH1/PMS2</i> .....	51
<b>TABELA 7</b>	Dados clínicos dos 376 pacientes com CCR abaixo de 50 anos.....	53
<b>TABELA 8</b>	Descrição de dados clínicos e variantes P e PP detectadas em 24 pacientes.....	56
<b>TABELA 9</b>	Características das variantes P, PP e VUS detectados em 71 pacientes através do sequenciamento do painel customizado de 62 genes.....	58
<b>TABELA 10</b>	Descrição de dados clínicos de 12 pacientes Lynch-Like e Amsterdam sem variantes P/PP.....	67
<b>TABELA 11</b>	Características clínicas dos 89 pacientes que passaram por análise de painel multigênico com 62 genes de predisposição ao câncer.....	69

## LISTA DE QUADROS

<b>QUADRO 1</b>	Critérios para câncer colorretal hereditário sem polipose - Critérios de Amsterdam I.....	23
<b>QUADRO 2</b>	Critérios ICG-HNPCC revisados (critérios de Amsterdam II).....	24
<b>QUADRO 3</b>	Diretrizes da Bethesda atualizada para testes de tumores colorretais para instabilidade de microssatélites.....	25
<b>QUADRO 4</b>	Critérios para classificar variantes como patogênicas.....	43
<b>QUADRO 5</b>	Critérios para classificar variantes como benignas.....	44

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

<b>ACCCC</b>	A.C. Camargo Cancer Center
<b>ACMG</b>	American College of Medical Genetics
<b>AFAP</b>	Polipose adematosa familiar atenuada
<b>APC</b>	Adenomatous polyposis coli
<b>BRAF</b>	Proto-oncogene B-Raf
<b>CCR</b>	Câncer colorretal
<b>CIMP</b>	Fenótipo metilador das ilhas CpG
<b>CIN</b>	Do Inglês, <i>chromosome instability</i> - via de instabilidade cromossômica
<b>CMS1 a 4</b>	Do inglês, <i>consensus molecular subtypes</i>
<b>Dmmr</b>	Deficiência no sistema MMR
<b>EDTA</b>	Edetetic acid
<b>EMT</b>	Transição epitélio-mesênquima
<b>EPCAM</b>	Epithelial cellular adhesion molecule
<b>ePCR</b>	PCR em emulsão
<b>FAN1</b>	Fancd2 and fanci associated nuclease 1
<b>FAP</b>	Polipose adenomatosa familiar
<b>FFPE</b>	Tecido congelado a fresco ou fixado em formalina e embebido em parafina
<b>HNPCC</b>	Câncer colorretal hereditário sem polipose
<b>IARC</b>	Agência internacional para pesquisa em câncer IARC
<b>IHQ</b>	Imuno-histoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional de Câncer
<b>KRAS</b>	Oncogene viral do sarcoma de rato Kirsten
<b>MLH1</b>	Proteína mutl homóloga 1
<b>MMR</b>	Mismatch repair
<b>MSH2</b>	Muts homólogo 2
<b>MSH6</b>	Muts homólogo 6
<b>MSI</b>	Instabilidade de microsatélite
<b>MUTYH</b>	Muty DNA glycosylase
<b>NCCN</b>	National comprehensive Cancer Network
<b>NGS</b>	Sequenciamento de nova geração
<b>NRAS</b>	Neuroblastoma ras viral (v-ras)
<b>PCR</b>	Reação em cadeia de Polimerase
<b>pMMR</b>	MMR proficiente
<b>PMS2</b>	Pms1 homolog 2
<b>SL</b>	Síndrome de Lynch
<b>SLL</b>	Síndrome de Lynch-like
<b>SPHC</b>	Síndrome de predisposição hereditária ao câncer
<b>VUS</b>	Variantes de significado clínico desconhecido

# Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Hereditariedade do câncer.....	18
1.2	Câncer colorretal hereditário.....	19
1.2.1	Epidemiologia do CCR – Incidência e mortalidade.....	19
1.2.2	Câncer colorretal em idade jovem.....	23
1.3	Estratégias de rastreamento para identificação de pacientes com SL.....	24
1.3.1	Critérios de Amsterdam I, II e Bethesda.....	24
1.3.2	Triagem universal para CCR.....	27
1.4	Vias de carcinogênese colorretal.....	29
1.5	Diagnóstico molecular em Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer.....	30
2.	JUSTIFICATIVA.....	32
3.	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivos Gerais.....	33
3.2	Objetivos Específicos.....	33
4.	MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1	Delineamento Experimental.....	34
4.2	Casuística e dados clínicos.....	35
4.3	Material biológico.....	36
4.4	Análise de metilação em <i>MLH1</i> e mutação em <i>BRAF</i> .....	36
4.4.1	Análise de Metilação do promotor de <i>MLH1</i> .....	36
4.4.2	Análise de mutação somática de <i>BRAF</i> .....	39
5.	Seleção de casos para análise genética.....	41
5.2	Deteção de variantes germinativas por sequenciamento de painel multi-genes.....	42
6.	Análises de bioinformática e seleção de variantes.....	44
6.1	Classificação de variantes segundo os critérios sugeridos pelo <i>American College of Medical Genetics (ACMG)</i> .....	44
7.	Análise estatística.....	47
8.	RESULTADOS.....	48
8.1	Validação de um teste NGS baseado em <i>amplicon</i> para avaliar a metilação do promotor <i>MLH1</i> e sua correlação com mutação em <i>BRAF</i> em pacientes com câncer colorretal.....	48
8.2	Correlação da metilação de <i>MLH1</i> , perda de expressão de <i>MLH1/PMS2</i> e status de mutação <i>BRAF</i> .....	52
8.3	Casuística e pacientes selecionados para sequenciamento de Painel Multigênico.....	54
8.4	Análise de variantes germinativas por sequenciamento de painel multi-genes.....	55
8.5	Comparações dados clínicos de pacientes com e sem alterações germinativas.....	71
9.	DISCUSSÃO.....	73

9.1 Validação do teste NGS baseado em <i>amplicon</i> para avaliar a metilação do promotor <i>MLH1</i> e sua correlação com a mutação <i>BRAF-V600E</i> em pacientes com câncer colorretal. ....	73
9.2 Sequenciamento de painel multi-gênico customizado com 62 genes de predisposição ao câncer.....	75
10. CONCLUSÃO .....	85
11. REFERÊNCIAS .....	86
ANEXO 1.....	95
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) .....	95
Anexo 2.....	102
Title: Validation of an amplicon based NGS test for assessing <i>MLH1</i> promoter methylation and its correlation with <i>BRAF</i> mutation in colorectal cancer patients .....	102

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Hereditariedade do câncer

Alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do câncer ocorrem em diferentes linhagens celulares dos indivíduos. Em cerca de 90% dos cânceres, essas alterações ocorrem apenas na linhagem somática das células, caracterizando assim os cânceres do tipo esporádicos, que se desenvolvem devido a alterações genéticas adquiridas ao longo da vida<sup>1</sup>. Por outro lado, cerca de 5 a 10% dos cânceres ocorrem em indivíduos com alterações genéticas na linhagem germinativa, ou seja, alterações caracterizadas como hereditárias e que levam ao desenvolvimento de câncer precocemente<sup>1</sup>.

O *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) recomenda a avaliação de pacientes com suspeita de câncer de padrão hereditário que possuam histórico pessoal e/ou familiar de câncer diagnosticado em idade mais jovem, dois ou mais diagnósticos de câncer ou famílias com múltiplos casos de câncer<sup>2</sup>. Já o *American College of Medical Genetics and Genomics* e a *National Society of Genetic Counselors*<sup>3</sup> desenvolveram diretrizes para apresentarem um único conjunto de critérios abrangentes referentes a história pessoal e familiar dos pacientes para facilitar a identificação e maximizar o encaminhamento adequado dos indivíduos em risco para consultas de aconselhamento genético<sup>3</sup>.

A identificação dessas famílias em risco para cânceres hereditários se tornou um aspecto importante em oncologia clínica. Avanços na área de genômica possibilitaram o aprimoramento de métodos de triagem (testes genéticos) e, conseqüentemente, permitiram a descoberta de mais de uma centena de genes de predisposição ao câncer<sup>4</sup>. Mutações germinativas em genes autossômicos de alta e moderada penetrância são responsáveis pela maioria das síndromes hereditárias de câncer já descritas<sup>4</sup>.

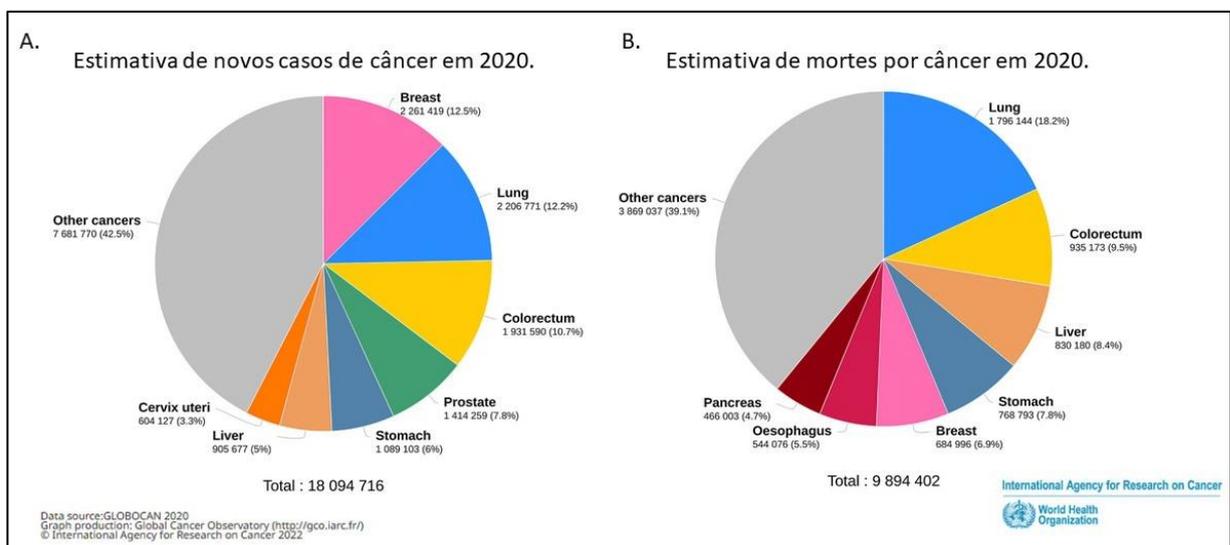
Devido a fatores desconhecidos que modulam a penetrância dos tumores e conferem maior variabilidade fenotípica, agregado ao risco de câncer sexo-específico, muitas famílias não preenchem os critérios clínicos de uma determinada síndrome de predisposição

hereditária ao câncer (SPHC) e não são elegíveis para indicação de teste genético relacionado e intervenção clínica direcionada<sup>4</sup>. Estas famílias são então classificadas na categoria de agregação familiar. Estima-se que pelo menos 15-20% dos tumores são encontrados em agregações familiares e podem ser causados por alterações genéticas ainda não identificadas <sup>4</sup>, necessitando com urgência identificar o componente genético associado para que estas famílias sejam devidamente assistidas.

## 1.2 Câncer colorretal hereditário

### 1.2.1 Epidemiologia do CCR – Incidência e mortalidade

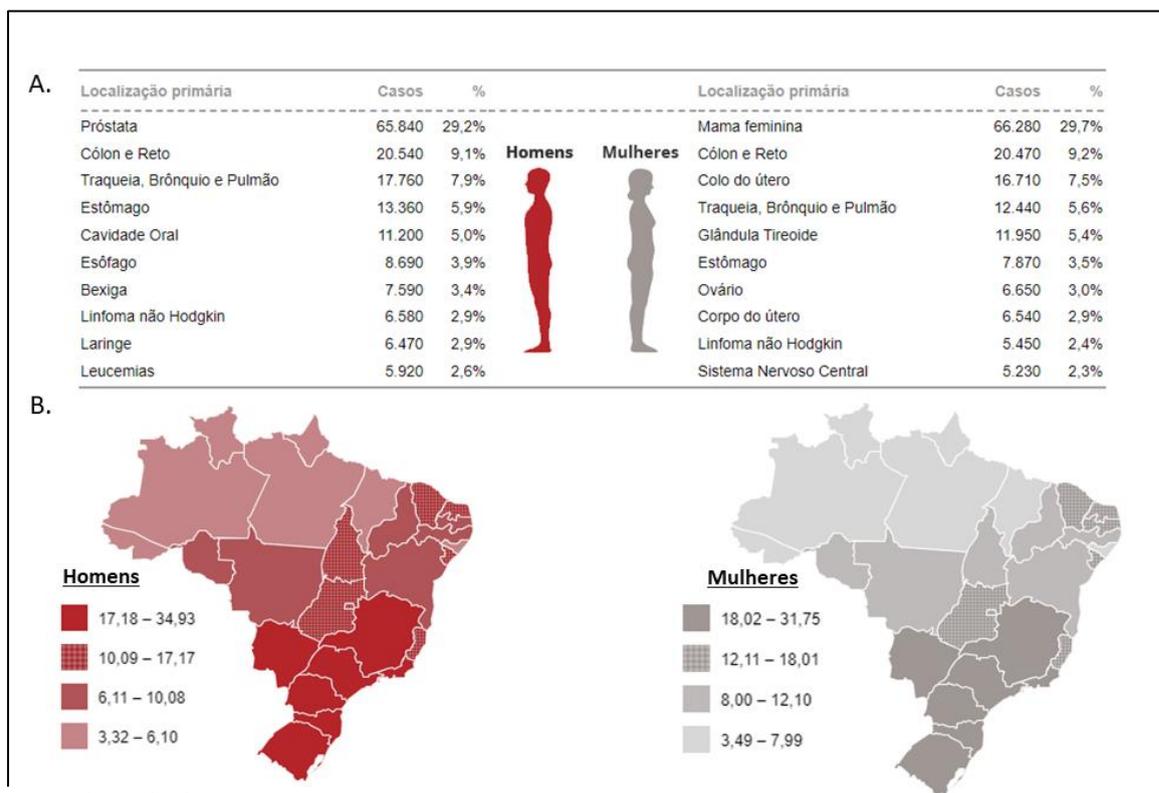
O câncer colorretal é o terceiro tipo de câncer mais comum em todo o mundo, segundo dados da Agência internacional para pesquisa em câncer (IARC) em 2020, cerca de 2 milhões de casos foram diagnosticados, além disso, câncer colorretal também é a segunda causa mais comum de morte por câncer, levando a quase 1 milhão de mortes por ano (Figura 1). Isso apesar do fato de existirem técnicas de triagem eficazes que poderiam reduzir o número de mortes por essa doença (IARC, 2022).



Fonte: Adaptado de International Agency for Research on Cancer, 2022.

**Figura 1** – Incidência e mortalidade de câncer no mundo. **(A)**: Estimativa de novos casos de câncer no mundo em 2020. **(B)**: Estimativa de mortes por câncer no mundo em 2020.

No Brasil o câncer colorretal é o segundo maior em incidência no país, sendo a incidência tanto em homens, quanto para mulheres no ano de 2022 de mais de 20 mil novos casos (**Figura 2**). Incidência essa que ocorre em maiores proporções nos estados das regiões Sul e Sul deste (INCA, 2022).



Fonte: Adaptado de: INCA, 2022.

**Figura 2** - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes no ano de 2020 por sexo. **(A)**: estimativa de novos casos de câncer no Brasil para ambos os sexos. **(B)**: estimativa de novos casos de câncer no Brasil distribuídos por estados para ambos os sexos.

As principais SPHC relacionadas ao CCR são a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e a Síndrome de Lynch (SL), as quais respondem por cerca de 6-8% de todos os casos de CCR <sup>5</sup>.

A FAP representa a segunda desordem hereditária mais comum em CCR, correspondendo a 1% dos casos da doença. Mutações germinativas no gene autossômico APC podem ser identificadas em 80-90% das famílias com polipose intestinal clássica acompanhado por um padrão de herança gênica dominante <sup>6</sup>. Existe uma variação fenotípica da FAP clássica, conhecida como Polipose Adenomatosa Atenuada (AFAP), caracterizada pela

presença de menos de 100 pólipos intestinais, predominantemente em partes mais proximais do cólon, e aparecimento mais tardio (em torno dos 50 anos). Cerca de 30% dos pacientes com a AFAP têm mutações germinativas identificadas no gene *APC*<sup>7</sup>.

O gene *MUTYH* foi identificado como um segundo gene associado à AFAP, porém relacionado a uma herança autossômica recessiva (chamada MAP – Polipose associada ao *MUTYH*). No entanto, para cerca de 10-15% dos pacientes portadores de polipose intestinal, mutações nos genes *APC* e *MUTYH* não são identificadas<sup>8</sup>. Os pacientes com MAP, além do câncer colorretal (CCR), podem desenvolver outros tipos de tumores, incluindo câncer de duodeno, mama, ovário, pâncreas, bexiga e pele. Portadores de variantes bialélicas *MUTYH* provavelmente patogênicas/expatogênicas exibem um alto risco de CCR ao longo da vida, embora a evidência de risco de câncer se torne menos clara quando portadores monoalélicos e tumores extraintestinais são considerados<sup>153</sup>. A MAP é causada por alterações bialélicas em *MUTYH*, que levam a inativação do gene e a uma alta ocorrência de transversões G:C para T:A, gerando frequentemente a mutação somática *KRAS* c.34G>T; G12C. A mutação ocorre em menos de 5% dos casos de câncer colorretal (CCR) esporádicos, mas é altamente frequente em CCR de pacientes MAP, ocorrendo em até 80% dos casos<sup>152</sup>.

Um subconjunto dos CCR hereditários ou esporádicos apresentam alterações na via dos genes de reparo de mal pareamento (MMR – do inglês *mismatch repair*) e exibem características clínico-patológicas distintas em comparação com a maioria dos CCRs esporádicos<sup>9</sup>. O tipo hereditário de câncer com deficiência de MMR é conhecido como Síndrome de Lynch (SL) ou câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC)<sup>9</sup>. Existe ainda um subgrupo de tumores esporádicos com deficiência de MMR ocasionada por mutações somáticas ou alteração de metilação do DNA e que acontecem apenas no tecido do tumor e, portanto, representam um fenômeno isolado na família, geralmente unilateral e de instalação mais tardia na vida<sup>10</sup>.

A SL representa de 2-6% de todos os casos de CCR e é caracterizada como uma síndrome de predisposição hereditária autossômica dominante causada por mutações germinativas em um dos quatro principais genes da via MMR: *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*<sup>11, 12, 13</sup>. Ainda, alterações de deleção que afetam a porção final do gene *EPCAM*, e com isso

afetam a expressão do gene *MSH2*, também estão relacionadas à SL. A inativação de um destes genes pode resultar em grande variedade fenotípica entre indivíduos<sup>11</sup>.

Mutações nestes genes são encontradas em 40% das famílias que preenchem os estridentes critérios de Amsterdam <sup>14. 15</sup>, levando a suposição da existência de genes de predisposição ao CCR ainda não descritos. Alguns autores denominam este grupo de pacientes que preenchem os critérios clínicos de Amsterdam, porém não apresentam perda dos genes de reparo na imuno-histoquímica e mutações patogênicas nos genes MMR, como “Síndrome de Câncer Colo retal Familiar “X” <sup>16</sup>. Ainda, cerca de 20-30% dos CCRs representam agrupamentos familiares de casos que não preenchem critérios para FAP ou SL, e podem possuir outra causa genética potencialmente identificável <sup>16.17</sup>, posicionando o CCR entre os tumores com uma das maiores proporções de agrupamentos familiares.

O A.C.Camargo Cancer Center é um dos primeiros centros de pesquisas brasileiro a desenvolver estudos sobre a Síndrome de Lynch nos pacientes brasileiros. Desde o fim da década de 90 até os dias atuais, nossa instituição desenvolve estudos a fim de compreender a correlação clínica e molecular dos pacientes portadores de câncer que pertencem a famílias com suspeitas de Síndrome de Lynch, como foram os estudos desenvolvidos por BM Rossi, 2000; MEVD Valentin, 2009; WT Nakagawa, 2010, FCC Da Silva, 2011; JRO Ferreira, 2014, entre outros.

Com o advento da tecnologia de sequenciamento de nova geração (NGS) novos genes associados à suscetibilidade ao câncer colorretal hereditário e à polipose colônica em um pequeno número de famílias puderam ser identificados. Atualmente são conhecidos mais de uma dezena de genes associados a essas condições, como os genes *BMPR1*, *SMAD4*, *STK11*, *PTEN*, *NTHL1*, *GREM1*, *POLE*, *POLD1*<sup>18</sup>. Estudos com aproximadamente 2.000 casos e controles de CCR também forneceram evidências para o papel dos genes *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CDKN2A*, *PALB2* e *TP53* na suscetibilidade ao CCR, a maioria deles levando a um aumento de risco moderado. Por fim, outros genes recentemente descritos ainda necessitam de validação mais extensa, como os genes *FAN1*, *BUB1* e *BUB3*, por exemplo <sup>18</sup>.

<sup>19</sup>.

Alguns laboratórios clínicos têm avaliado painéis mutigênicos com

aproximadamente 40 genes ditos como associados à suscetibilidade para câncer colorretal hereditário e à polipose, apesar de somente uma parcela desses genes terem sido avaliados quanto a sua validade clínica de forma rigorosa. Segundo as recomendações do NCCN, em sua diretriz mais recente para câncer colorretal hereditário, existe evidência forte de relevância clínica para 22 genes de risco para CCR e polipose<sup>19.20. 21. 22.</sup>

Quanto mais informações sobre o espectro de variantes patogênicas nesses genes forem obtidas, e em diferentes populações, melhor será a interpretação dos laboratórios que desenvolvem os testes de diagnóstico em relação aos seus achados, propiciando melhores condutas clínicas para os pacientes<sup>20. 21. 22. 23. 24.</sup>

### **1.2.2 Câncer colorretal em idade jovem**

A incidência de CCR de início precoce, que ocorre em indivíduos <50 anos de idade, vem aumentando em todo o mundo e particularmente em países desenvolvidos. As hipóteses sobre esse crescimento incluem uma maior exposição a potenciais fatores de risco, como dieta ao estilo ocidental, obesidade, sedentarismo e uso de antibióticos, especialmente durante o pré-natal precoce à adolescência<sup>25</sup>. Essas exposições podem não apenas causar alterações genéticas e epigenéticas nas células epiteliais colorretais, mas também afetar a microbiota intestinal e a imunidade do hospedeiro<sup>25. 26</sup>. De acordo com a literatura, uma fração não desprezível de pacientes com CCR é diagnosticada antes dos 40 anos, em aproximadamente 0,8 a 14,6% dos casos<sup>28</sup>. Além disso, publicações recentes documentaram um crescimento desproporcional na incidência de CCR entre pessoas jovens. Estudos demonstraram um aumento de 6,8% (1982 - 1990) para 8,4% em (2000-2017)<sup>28. 29</sup>.

Notavelmente, aproximadamente 30% dos pacientes com CCR de início precoce têm história familiar de CCR em pelo menos um parente de primeiro grau<sup>30. 31</sup>. A prevalência de história familiar positiva para câncer é maior em pacientes com CCR com menos de 40 anos de idade do que em pacientes mais velhos, variando de 17 a 27%<sup>33. 34</sup>. Embora as síndromes de CCR hereditário possam aparecer como explicações plausíveis, as principais síndromes hereditárias conhecidas representam uma pequena proporção, cerca

de 15 a 19% dos jovens <sup>34, 31</sup>.

Pesquisadores colaboradores da University of Texas MD Anderson Cancer Center desenvolveram um fluxo para estratificar o risco de hereditariedade para casos de CCR desenvolvidos em idade jovem (< 50 anos) <sup>36</sup>. Dados preliminares do grupo reforçam a possível existência de genes de predisposição ao CCR ainda não descritos, uma vez que somente 17% dos casos de CCR <50 anos estão associados à SL, FAP ou AFAP, enquanto 23% dos casos possuem história familiar de CCR entre parentes de primeiro e segundo grau e não apresentam mutações germinativas detectadas nos genes relacionados a essas síndromes. Portanto, para alguns casos com risco hereditário incontestável, o teste genético para genes de alta penetrância falha em revelar mutações patogênicas. Casos como esses são categorizados como de “hereditariedade incompreendida” em decorrência da falta de conhecimento científico a respeito da etiologia da predisposição genética<sup>36</sup>.

### 1.3 Estratégias de rastreamento para identificação de pacientes com SL

#### 1.3.1 Critérios de Amsterdam I, II e Bethesda

Em 1990, o *International Collaborative Group on HNPCC* (ICG-HNPCC) realizou uma reunião em Amsterdam em 1990 num esforço de estabelecer um conjunto de critérios de seleção para famílias com câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC, síndrome de Lynch), esses critérios ficaram conhecidos como critérios de Amsterdam I (**Quadro 1**) <sup>37</sup>.

**Quadro 1** - Critérios para câncer colorretal hereditário sem polipose - Critérios de Amsterdam I. Adaptado e traduzido de <sup>37</sup>.

Critérios de Amsterdam I
Pelo menos 3 familiares com CCR (verificados por exame patológico) e:
1 - Um deve ser parente de primeiro grau dos outros dois;
2 - Pelo menos 2 Gerações sucessivas devem ser afetadas;
3 - Pelo menos 1 CCR deve ser diagnosticado antes dos 50 anos;
4 - A polipose adenomatosa familiar deve ser excluída.

CCR – câncer colorretal.

Até 1990, tais critérios não existiam e as descrições da síndrome na literatura variavam muito. Alguns pesquisadores criticavam o critério de Amsterdam I, pois achavam que os critérios excluía algumas famílias clássicas de HNPCC por não levarem em consideração os cânceres extracolônicos que fazem parte da síndrome. Além da preocupação de que os critérios estivessem sendo usados de forma inadequada para o diagnóstico de HNPCC <sup>36,37</sup>.

Assim, para resolver esses problemas, critérios adicionais foram criados por vários pesquisadores <sup>36 37. 38. 39</sup> propondo uma definição de HNPCC que ajudasse os médicos a identificar as famílias clássicas <sup>37</sup>. Em 1998 o conjunto de novos critérios clínicos foram apresentados foi proposto se criando assim os Critérios ICG-HNPCC revisados (critérios de Amsterdam II) (**Quadro 2**) <sup>41</sup>.

**Quadro 2** - Critérios ICG-HNPCC revisados (critérios de Amsterdam II). Adaptado e traduzido de <sup>42</sup>.

<b>Critérios de Amsterdam II</b>
Pelo menos 3 parentes com câncer associado ao HNPCC (CCR, câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pelve renal*): Um deve ser parente de primeiro grau dos outros;
1 - Um deve ser parente de primeiro grau dos outros dois;
2 - Pelo menos 2 Gerações sucessivas devem ser afetadas;
3 - Pelo menos 1 Câncer deve ser diagnosticado antes dos 50 anos;
4 - A polipose adenomatosa familiar deve ser excluída no (s) caso (s) de CCR, se houver.
*Tumores devem ser verificados por exame patológico sempre que possível.

CCR – câncer colorretal.

Ainda em 1996, a Divisão de Detecção Precoce do Instituto Nacional do Câncer convocou um workshop internacional em Bethesda, MD, intitulado "A Intersecção de Patologia e Genética na Síndrome do Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (HNPCC)". As discussões basearam-se na instabilidade genômica, carcinogênese em várias etapas e o papel dos genes de reparo de incompatibilidade em HNPCC, histopatologia de HNPCCs e possíveis relações com alterações genéticas moleculares, marcadores de proliferação celular e sua relação com HNPCC, bem como seu uso potencial no diagnóstico precoce e prognóstico, e, por último, critérios clínico-patológicos que possam levar à identificação de pacientes adicionais de HNPCC <sup>43</sup>.

Após o workshop, houve um amplo debate. Um dos tópicos considerados foi se existe uma histopatologia específica que pudesse distinguir os HNPCCs dos tumores colorretais esporádicos. Foi discutido sobre a presença da instabilidade de microssatélites em cerca de 90% dos CCR em parentes de HNPCC. Após muita discussão, foram desenvolvidos critérios (**Diretrizes de Bethesda**) para a identificação de tumores que deveriam ser testados para instabilidade de microssatélites e, portanto, auxiliar na identificação de pacientes com HNPCC <sup>42, 43</sup>. Essas diretrizes foram revistas e atualizadas em outro workshop sobre HNPCC realizado pelo National Cancer Institute em Bethesda em 2002, gerando as Diretrizes de Bethesda atualizada, que é a mais comumente utilizada para selecionar indivíduos em risco para Síndrome de Lynch.

**Quadro 3** - Diretrizes da Bethesda atualizada para testes de tumores colorretais para instabilidade de microssatélites. Adaptado e traduzido de “revised Bethesda Guidelines” <sup>45</sup>.

<b>Critérios de Bethesda REVISADOS</b>
1 - CCR diagnosticado antes dos 50 anos;
2 - Presença de CCR sincrônico e/ou metacrônico ou outros tumores relacionados à síndrome*, independente de idade;
3 - Câncer colorretal com histologia† de instabilidade de microssatélite alta, diagnosticado antes dos 60 anos;
4 - Paciente com CCR e um parente com tumor relacionado com a síndrome, com um dos cânceres diagnosticados antes dos 50 anos;

5 - Paciente com CCR com dois ou mais parentes de 1° e 2° grau com tumores relacionados a síndrome, independentemente da idade.

\*Câncer endometrial, ovariano, gástrico, hepatobiliar ou do intestino delgado ou carcinoma de células transicionais da pelve renal ou ureter. †Presença de infiltrado linfocitário no tumor, reação linfocítica tipo Crohn, diferenciação mucinosa/em anel de sinete ou padrão de crescimento medular. ‡Composto por >50% de células em anel de sinete. Adaptado e traduzido <sup>46</sup>.

### 1.3.2 Triagem universal para CCR

A chamada triagem universal, com realização de imuno-histoquímica (IHQ) ou análise de instabilidade de microssatélite (MSI) de todos os casos recém-diagnosticados de CCR, independentemente da idade de início e história familiar, é uma abordagem recomendada por várias diretrizes de especialistas para aumentar a identificação dos casos de síndrome de Lynch, pois pode aumentar o diagnóstico de SL e reduzir a morbidade e mortalidade de cânceres associados à SL e conseqüentemente possibilitar a identificação de indivíduos com risco para câncer hereditário, <sup>46. 47. 48. 49. 50. 51. 52</sup>, o rastreamento universal com análise de IHQ das proteínas MMR é realizado desde 2010 para quase todos os pacientes com diagnóstico de câncer colorretal, independentemente da idade.

O achado mais desafiador nos programas de rastreamento universal é a ausência de expressão de *MLH1*. CCRs que apresentam instabilidade de microssatélite (MSI) e perda de expressão de *MLH1* são observados em três cenários clínicos: síndrome de Lynch (SL), CCR com MSI esporádico e síndrome de Lynch-like (SLL) <sup>54</sup>. A grande maioria dos casos com perda de *MLH1* não se deve à mutação germinativa neste gene, mas sim à metilação somática de seu promotor. O gene *MLH1*, como outros genes supressores de tumor, é propenso a ser silenciado pela metilação do promotor em uma das vias de carcinogênese de CCR <sup>54. 55. 56</sup> e aproximadamente 12% dos cânceres colorretais esporádicos exibem metilação do promotor *MLH1*.

Existem atualmente dois ensaios para determinar diretamente ou inferir

indiretamente se a metilação do promotor *MLH1* está presente e, portanto, excluir a necessidade de testes genéticos germinativos para a síndrome de Lynch. O primeiro seria o ensaio direto para a metilação do promotor *MLH1* que é realizada em DNA de tumor, através de técnicas de conversão por bissulfito. Uma segunda abordagem molecular alternativa é realizar o teste para a mutação V600E no gene *BRAF* para distinguir casos de câncer colorretal associados à síndrome de Lynch e esporádicos, uma vez que metilação do promotor *MLH1* está altamente correlacionada com a presença de mutação *BRAF* V600E em CCR <sup>57. 58. 59</sup>.

Estudo comparativo envolvendo a análise de metilação do promotor de *MLH1* e a análise de mutação somática no gene *BRAF* para excluir pacientes com SL demonstraram uma sensibilidade de 100% quando feita análise de mutação somática em *BRAF*, enquanto que a análise de metilação no promotor *MLH1* apresentou uma sensibilidade de 84,2% para exclusão de pacientes com SL. A partir dos achados foi possível inferir que a análise somática do *BRAF* é a estratégia mais sensível para excluir pacientes com SL <sup>54</sup>.

Estima-se que cerca de 10% dos cânceres colorretais esporádicos são caracterizados pelo fenótipo MSI-H e perda da proteína MLH1 na análise imuno-histoquímica devido à hipermetilação da região promotora do gene *MLH1* <sup>55 149</sup>. Estudos realizados por Deng et al, mostraram que a metilação em uma região proximal do promotor *hMLH1* invariavelmente se correlaciona com a ausência de expressão em linhagens celulares de câncer colorretal<sup>150</sup>. Nesse estudo foi observado uma extensa metilação dos sítios de CpG nas regiões C/D do promotor *hMLH1* em todas as linhagens celulares de câncer colorretal que apresentavam ausência de expressão de MLH1. Num segundo estudo Deng et al, 2002, para verificar se essa observação existe em tumores primários, foi medido a metilação de *MLH1* nos tumores primários e suas contrapartes normais. Foi observada uma metilação parcial (40-60%) na região distal de *MLH1* em todos os tecidos normais e tumorais testados, sem correlação com a presença ou ausência de expressão de MLH1. Por outro lado, quando a metilação estava presente apenas em uma região proximal do promotor (regiões C/D), esta se correlacionava com a ausência de expressão proteica<sup>151</sup>.

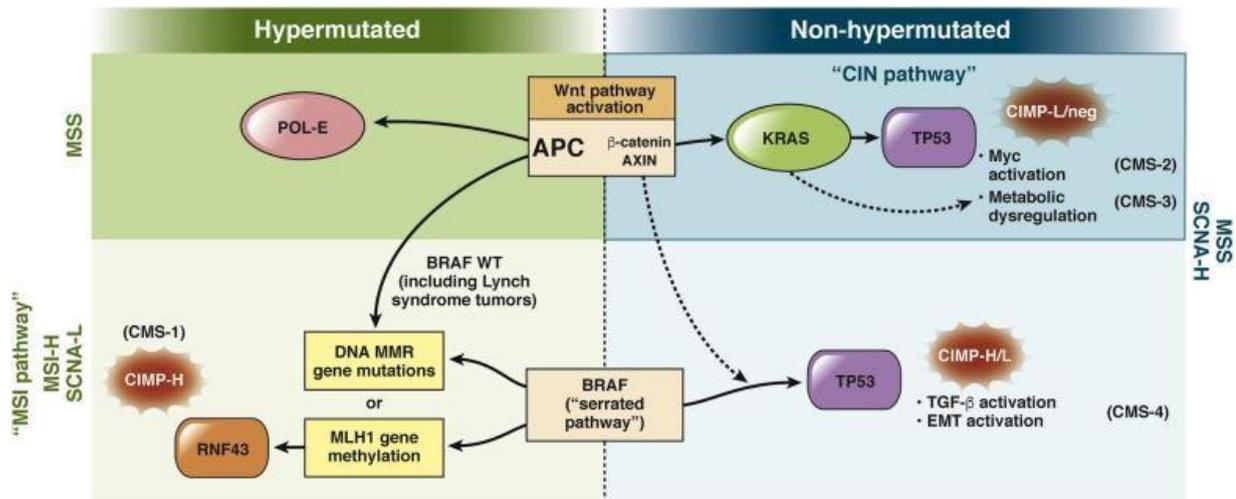
## 1.4 Vias de carcinogênese colorretal

O câncer colorretal acomete regiões do cólon e o reto levando ao surgimento de tumores malignos provenientes do tecido glandular que é característico do órgão e seu desenvolvimento ocorre por vias moleculares relacionadas a susceptibilidade genética ou a causas esporádicas, proveniente exclusivamente de alterações somáticas <sup>61</sup>.

Três diferentes vias principais de instabilidade genômica foram descritas como relacionadas carcinogênese colorretal, sendo possível uma sobreposição entre eventos moleculares dessas vias (**Figura 3**):

- a) A via de instabilidade cromossômica (CIN, do inglês *chromosome instability*) se caracteriza pelo surgimento de mutações no gene supressor tumoral *APC*, mutações de ativação do oncogene *KRAS* nos estágios iniciais da progressão tumoral, perda de heterozigosidade no cromossomo 18q nos estágios mais avançados e mutação no gene supressor de tumor *TP53*;
- b) A via de instabilidade de microssatélites (MSI), ocorre por mutações em um dos genes do sistema de reparo MMR (germinativas ou somáticas). Os eventos que iniciam a tumorigênese pela via MSI variam. Mutações em *APC* são encontradas em 35–50% dos tumores MSI, de modo que o evento inicial da formação de adenoma pode ser compartilhado por tumores MSI e CIN. No entanto, um conjunto distinto de tumores MSI pode se desenvolver por meio de mutações em *BRAF*, as quais estão geralmente associadas com a metilação do promotor do gene *MLH1*. Esses tumores compartilham características das vias MSI e da via de carcinogênese de neoplasias serrilhadas <sup>62</sup>.
- c) A via do fenótipo metilador das ilhas CpG (CIMP) está associada com a hipermetilação de promotores gênicos onde se encontram a maioria das ilhas CpG, resultando no silenciamento gênico de genes supressores de tumor <sup>63</sup>. Os mecanismos associados a CIMP ainda não são bem compreendidos, mas a maioria dos estudos sugerem uma associação entre a ativação do oncogene *BRAF* e a patogênese de CCR CIMP-high <sup>64</sup>. Tumores CIMP-high representam aproximadamente 20% dos tumores colorretais, e mais de 50% deles são *BRAF*-mutados e *MLH1*- hipermetilados, características que descrevem uma grande fração de tumores MSI- High <sup>62</sup>.

Ainda, outras classificações moleculares baseadas em expressão gênica foram propostas para CCR, que resultaram na classificação desses tumores em 4 subtipos moleculares (CMS1 a 4 – do inglês, *consensus molecular subtypes*) nos quais as características moleculares CIN, MSI, CIMP e ativação do sistema imune também apresentam um papel importante <sup>62</sup>.



Fonte: Nguyen, 2020.

**Figura 3.** Vias de carcinogênese colorretal. A ativação da via Wnt (principalmente via mutação em *APC*) ou mutação em *BRAF* pode iniciar a tumorigênese colorretal. Mutações *BRAF* promovem tumorigênese pela via da neoplasia serrilhada, levando a MSI com hipermutação ou MSS sem hipermutação (indicado na figura). As classificações de tumores colorretais incluem CIN, MSI e a via serrilhada. EMT, transição epitélio-mesênquima; H, alto; L, baixo; neg, negativo.

### 1.5 Diagnóstico molecular em Síndromes de Predisposição Hereditária ao Câncer

A evolução, desenvolvimento e a disponibilidade de tecnologias de sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*) permitiram análises simultâneas eficientes de muitos genes de predisposição ao câncer em pacientes oncológicos ou indivíduos assintomáticos em risco em diagnósticos de rotina <sup>65</sup>. As

tecnologias NGS oferecem várias abordagens para a investigação da predisposição ao câncer, incluindo o sequenciamento de genomas inteiros, exomas ou transcriptomas. Atualmente, o método mais utilizado para detectar alterações genéticas clinicamente informativas são painéis NGS direcionado, analisando subconjuntos selecionados de genes de interesse de rápida e maneira custo-efetiva <sup>65.66</sup>.

O diagnóstico molecular tem gerado uma grande quantidade de informação e contribuído para a compreensão dos mecanismos moleculares do câncer. Embora ainda existam incertezas em alguns resultados de sequenciamentos gênicos (como as variantes de significado clínico desconhecido - VUS), a detecção de uma variante patogênica em um paciente pode levar à opção de realização de testes direcionados para seus familiares e outras modificações na conduta clínica para rastreamento e prevenção de novos tumores <sup>67</sup>.

O sequenciamento de genes associados ao câncer hereditário por NGS e a identificação, sinalização e classificação de suas variantes e do seu significado clínico a partir de bancos de dados e softwares de predição são importantes devido a sua implicação na clínica. A identificação de indivíduos com SPHC é importante porque indivíduos afetados apresentam risco cumulativo vital, muito superior ao da população, para o desenvolvimento de outros tumores primários <sup>68</sup>.

Além disso, os familiares de um indivíduo afetado podem estar em risco, já que a maioria dessas doenças genéticas segue um padrão de herança autossômica dominante. E medidas de rastreamento intensivo mostram-se eficazes em permitir diagnósticos mais precoces. Para mais, a identificação de portadores permite delinear estratégias para redução de risco, quimioprevenção, cirurgias profiláticas, e mais recentemente, definição de terapias alvo específicas <sup>68</sup>.

## 2. JUSTIFICATIVA

A identificação de alterações germinativas de predisposição para tipos específicos de câncer fornece a informação necessária para um melhor entendimento das bases moleculares do câncer hereditário, impactando de forma significativa em uma melhor assistência e acompanhamento de famílias portadoras.

Estudos objetivando a caracterização indivíduos com CCR hereditário debatem a existência de genes de predisposição ainda não descritos ou pouco explorados ao mostrar que mutações nos genes relacionados à Síndrome de Lynch são encontradas em apenas 30-40% das famílias que preenchem os critérios de Amsterdam <sup>68. 61. 43. 69. 15. 70</sup>. Ainda, o aumento da incidência de CCR de início precoce que vem ocorrendo em todo o mundo reforça a necessidade de compreendermos as causas e fatores de risco do CCR em diferentes populações.

Diante disso, fica evidente a necessidade de utilizar estratégias para selecionar pacientes em risco, identificar as causas genéticas dos tumores hereditários e validar genes recentemente descritos como de predisposição ao CCR em pacientes Brasileiros.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivos Gerais**

Descrever o padrão clínico e molecular associado aos casos de câncer colorretal em idade jovem (<50 anos) e identificar variantes germinativas de predisposição que elucidem esses casos.

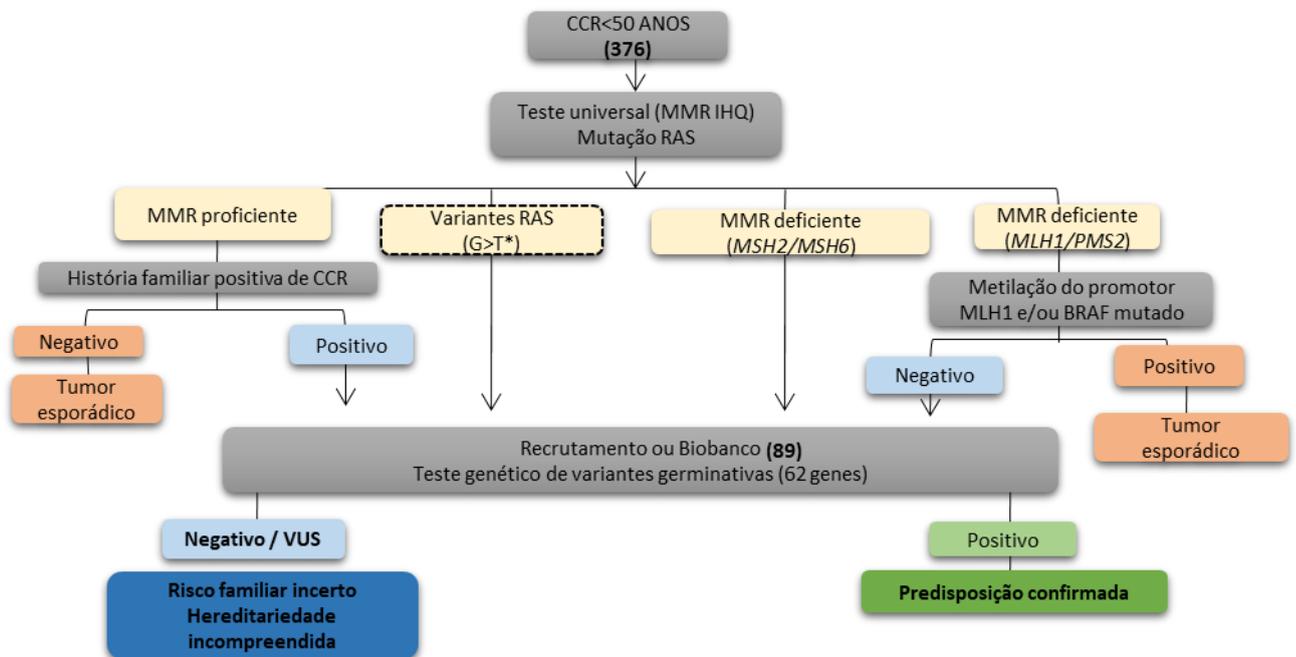
#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Correlacionar
- Desenvolver uma metodologia baseada em NGS para avaliação de metilação no promotor do gene *MLH1*.
- Caracterizar molecularmente amostras tumorais de um grupo de pacientes, a fim de identificar os subgrupos com deficiência nos genes de reparo relacionados a causas esporádicas (metilação de *MLH1* e mutação de *BRAF*).
- Identificar variantes germinativas de predisposição ao CCR realizando o sequenciamento para genes de predisposição já conhecidos e emergentes;
- Correlacionar características clínicas com as alterações germinativas patogênicas identificadas.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Delineamento Experimental

O desenho experimental demonstrado na figura 4 ilustra as etapas do estudo: seleção dos casos com CCR antes dos 50 anos, classificação dos casos selecionados de acordo com informações disponíveis em prontuário (IHQ das proteínas MMR, análise de mutação de *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*), seleção de casos para as etapas de análise de metilação de *MLH1* e avaliação de mutação em *BRAF*, avaliação de histórico familiar de CCR, seleção de casos para o sequenciamento germinativo de painel de genes de predisposição ao CCR.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 4** - Esquema representativo do delineamento experimental do projeto.

Casos com CCR desenvolvido antes dos 50 anos de idade foram avaliados quanto à caracterização molecular do tumor, através de teste tumoral universal (IHQ de proteínas MMR) e avaliações adicionais quando necessário (metilação de *MLH1* e mutação somática em *BRAF*), seguido por avaliação da história familiar e avaliação para mutações germinativas que conferem predisposição a CCR (para os casos ainda não rastreados). \* Inclusão de grupo de pacientes com mutações somáticas no CCR do tipo G>T nos genes *KRAS* ou *NRAS*, uma vez que uma parcela destes pacientes pode ser portadora de variantes patogênicas em *MUTYH* (Aimé et al. 2015).

## 4.2 Casuística e dados clínicos

Como critérios de inclusão, foram selecionados para o estudo casos que desenvolveram CCR em idade jovem, antes dos 50 anos, com informações clínicas disponíveis em prontuário eletrônico. Foram excluídos do projeto àqueles pacientes com diagnóstico de FAP clássica e pacientes da etapa prospectiva que não desejaram participar do estudo. Os pacientes foram obtidos através do banco de dados de pacientes operados do Centro de Referência Tumores Colorretais entre os anos de (2007 e 2020), busca no sistema Recruit (pacientes com CCR metastático) e banco de dados do Laboratório de Diagnóstico Genômico para selecionar pacientes com teste molecular do gene *KRAS* e mutação do tipo c.34G>T; p.G12C.

Foram coletadas nos bancos de dados citados e revistos nos prontuários hospitalares eletrônicos as características clínicas dos pacientes (sexo e idade), características do tumor (histologia, localização, IHQ das proteínas MMR, mutações nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*), e histórico pessoal e familiar de câncer (tumores CCR, idade ao diagnóstico, tumores extracolônicos). Segundo o histórico familiar de câncer, os pacientes foram classificados como: 1) positivo para CCR em parente de primeiro grau, 2) positivo para CCR em parente de segundo grau, 3) Amsterdam I/II, 4) histórico negativo para CCR, 5) sem informação.

O teste tumoral universal que inclui avaliação por IHQ das proteínas do sistema MMR é realizado como parte da rotina de avaliação patológica dos tumores, portanto, esses dados foram recuperados dos prontuários dos pacientes. Para os tumores colorretais que foram diagnosticamente a partir do ano de 2015, a avaliação de mutação somática no gene *BRAF* também é parte integrante da avaliação patológica do tumor e a informação também foi recuperada dos prontuários. Tumores diagnosticados anteriormente a esta data e com perda de expressão de MLH1/PMS2 foram avaliados no presente estudo quanto ao status de mutação somática em *BRAF*. A avaliação da metilação no gene *MLH1* no tumor não integra as avaliações realizadas rotineiramente no ACCCC e, portanto, foi realizada no presente estudo nos tumores com perda de expressão de MLH1/PMS2 e em outros tumores sem perda (para validação da técnica). Apenas para a etapa de validação da técnica de avaliação da metilação no gene *MLH1* foram incluídos casos de pacientes com CCR diagnosticados

após os 50 anos, e que apresentaram perda de expressão de *MLH1/PMS2*.

### **4.3 Material biológico**

O estudo utilizou amostras de tumor obtidas no Biobanco (tumor congelado a fresco) ou em material de arquivo do Departamento de Anatomia Patológica (tumor embocado em parafina) e de sangue periférico ou saliva, que foram obtidas tanto retrospectivamente como prospectivamente.

As amostras prospectivas de sangue periférico ou saliva para a realização dos testes genéticos foram obtidas mediante convocação do paciente e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (anexo 1). O sangue foi coletado em anticoagulante EDTA e a saliva foi obtida utilizando tubo coletor apropriado Oragene DNA OG-500 (DNA Genotek Inc. Ottawa, Canada). O DNA do tumor, sangue ou saliva foi extraído em condição padronizada seguindo protocolos estabelecidos pelo Biobanco da instituição. A qualidade e quantificação dos DNAs obtidos foram avaliadas através do espectrofotômetro NanoDrop® ND-1000 (ThermoFisherScientific, MA, Estados Unidos) e Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher Scientific, MA, Estados Unidos), respectivamente.

### **4.4 Análise de metilação em *MLH1* e mutação em *BRAF***

#### **4.4.1 Análise de Metilação do promotor de *MLH1***

A análise de metilação do promotor do gene *MLH1* foi realizada por sequenciamento de nova geração após conversão do DNA tumoral por bissulfito de sódio. Esta técnica envolve o tratamento de DNA com bissulfito de sódio, que converte citosinas (C) não metiladas em uracilas (U). As C metiladas permanecem inalteradas após o tratamento. Uma vez convertido, o perfil de metilação do DNA pode ser determinado através de PCR seguida por alguma metodologia de sequenciamento de DNA quantitativa. Durante a reação de PCR a uracila é substituída pela timina. O DNA convertido pode então ser analisado por

sequenciamento, sendo que a conversão de C para T significa citosina não-metilada enquanto C que permanece C significa citosina metilada. Neste estudo, utilizamos como metodologia o NGS na plataforma Ion Proton (Thermo Scientific).

Para isto, inicialmente delimitamos a região do promotor de *MLH1* a ser analisada entre as posições -143 a -264 do local de início da transcrição do gene (NM\_000249.3), região de 121 pares de bases que apresenta 5 dinucleotídeos CpGs e é avaliada em kits comerciais validados para avaliação de metilação neste gene (kit PyroMark Q24 CpG *MLH1* – Qiagen). *Primers* específicos para amplificar esta região foram desenhados, considerando a sequência convertida da região (*MLH1\_met\_F*: AGGTTATAAGAGTAGGGTT; *MLH1\_met\_R2*: AACCYAACTTATATACCTCTACT).

Para a reação de conversão por bissulfito de sódio, 20ul de DNA do tumor (tecido congelado a fresco ou fixado em formalina e embebido em parafina (FFPE) (sendo a concentração final de aproximadamente 50 ng totais) foi tratado com o kit EZ DNA Methylation-Gold (ZYMO RESEARCH), seguindo o protocolo do fabricante. O DNA convertido foi submetido à reação de PCR para gerar *amplicons* da região de interesse e os produtos das reações de PCR foram avaliados em gel de agarose. Inicialmente foi realizada uma padronização de PCR, onde foram testadas diferentes concentrações de magnésio, de DNA e temperaturas de anelamento.

As concentrações ideais de magnésio e DNA padronizadas estão descritas na Tabela 1. A temperatura de anelamento em que foi melhor observado a amplificação da região alvo, foi obtida através da técnica de *touch down*, que consiste em diminuir 0,2 graus a cada ciclo (Tabela 2).

**Tabela 1** - Concentrações padronizadas da PCR para análise de metilação no gene *MLH1*.

PROCOLO PLATINUM – PCR	VOLUME
H2O	20,55 ul
BUFFER TAQ HF 10X	3 UL
MGSO4 50MM	1,2 ul
DNTP 10MM	0,6 ul
PRIMER FORWARD 10 MM	0,5 ul
PRIMER REVERSE 10 MM	0,5 ul
TAQ HIGH-FIDELITY 1U/ UL	0,15 ul
DNA CONVERTIDO 10 NG/ UL	3,5 ul
VOLUME FINAL	30 ul

Fonte: Autoria própria.

ul – Microlitros.

**Tabela 2** - Protocolo de ciclagem da PCR para análise de metilação no gene *MLH1*.

TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
94°C	2m	1X
94°C	30s	40X
50°C	30s	
↓ 0,2°C A CADA CICLO		
68°C	1m	
68°C	10m	1X
4°C∞		

Fonte: Autoria própria.

m - Minutos; s - Segundos; x - Quantidade de ciclos.

Após a confirmação de amplificação por análise em gel de agarose, o volume restante da reação de PCR (25uL) foi utilizado para construção das bibliotecas de *amplicon* com o *kit Ion Plus Fragment Library (Thermo Fisher)*, de acordo com as instruções do fabricante. Resumidamente, este kit realiza a ligação de adaptadores (P1 e A) e *barcodes* (junto do

adaptador A) aos fragmentos de PCR. Os adaptadores direcionam as etapas de PCR em emulsão (ePCR) e sequenciamento, enquanto que os *barcodes* são sequências únicas que permitem a identificação de cada amostra após a corrida de sequenciamento. Para o sequenciamento, a etapa de PCR em emulsão (ePCR) foram realizadas com o Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit. Esta etapa permite a amplificação clonal dos fragmentos das bibliotecas, através da formação de micelas que possuem uma *bead* com sequência complementar a P1, e reagentes necessários para amplificação dos fragmentos. Após a ePCR foi realizada a etapa de enriquecimento, em que apenas as *beads* com fragmentos de DNA amplificados são selecionadas. Por fim, o sequenciamento foi realizado utilizando o Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit, juntamente com o Ion PI™ Chip Kit v3. O sequenciamento nesta plataforma ocorre através da incorporação cíclica de nucleotídeos, que ao serem incorporados resultam na liberação de íon H<sup>+</sup> por ligação fosfodiéster, gerando uma alteração no pH da reação, que é detectado pelo equipamento.

Após o sequenciamento, foi utilizado o software CLC para a análise da metilação nos dinucleotídeos CpG. As sequências geradas foram mapeadas na referência convertida da região utilizando o software CLC Genomics Workbench. As frequências das bases C e T de cinco citosinas CpGs e de três citosinas controles (não CpGs) foram anotadas e foi considerada a média entre os quatro CpGs de menor desvio. Inicialmente fizemos a anotação das frequências das bases C e T para as cinco regiões CpGs, porém observamos que uma das citosinas apresentava uma porcentagem de metilação que divergia consideravelmente das demais, assim foi considerada a média entre os quatro CpGs de menor desvio. A conversão por bissulfato de sódio foi considerada eficiente quando a média da frequência de bases C na região das três citosinas controles é <2%. As amostras foram consideradas positivas para metilação de *MLH1* quando a média da frequência de bases C na região das 4 citosinas CpGs foi >10%.

#### **4.4.2 Análise de mutação somática de BRAF**

Para a detecção da alteração p.Val600Glu (V600E) no gene *BRAF* foi utilizada a metodologia de sequenciamento de *amplicon*. Para isto, *primers* específicos para esta

alteração foram desenhados (*BRAF\_V600E\_F*:TTCATGAAGACCTCACAGTAAAAA; *BRAF\_V600E\_R*: GGATCCAGACAACTGTTCAAA), utilizando a ferramenta *online Primer 3*. Os DNAs extraídos de tumor (tecido congelado a fresco ou FFPE) foram submetidos a reações de PCR para gerar *amplicons* da região de interesse (**Tabela 3**).

Os produtos das reações de PCR foram avaliados em gel de agarose, e o volume restante foi utilizado para construção das bibliotecas de *amplicon* com o *kit Ion Plus Fragment Library* (Thermo Fisher), de acordo com as instruções do fabricante e descritos no item anterior.

**Tabela 3** - Detalhamento do Protocolo para análise de mutação no gene *BRAF*.

PROTOCOLO GO TAQ – PCR	VOLUME
ENZIMA GO TAQ GREEN 1U/UL	12,5 ul
PRIMER F 10 MM	0,5 ul
PRIMER R 10 MM	0,5 ul
DNA (5 A 50 NG/UL )	2 ul
ÁGUA	9,5 ul
<b>VOLUME FINAL</b>	<b>25 ul</b>

Fonte: Autoria própria.

uL– Microlitros.

**Tabela 4** - Protocolo de ciclagem da PCR para análise de mutação no gene *BRAF*.

TEMPERATURA	TEMPO	CICLOS
95°C	2 m	1X
95°C	30 s	
60°C	1 m	35X
72°C	45s	
72°C	5 m	1X
4°C ∞		

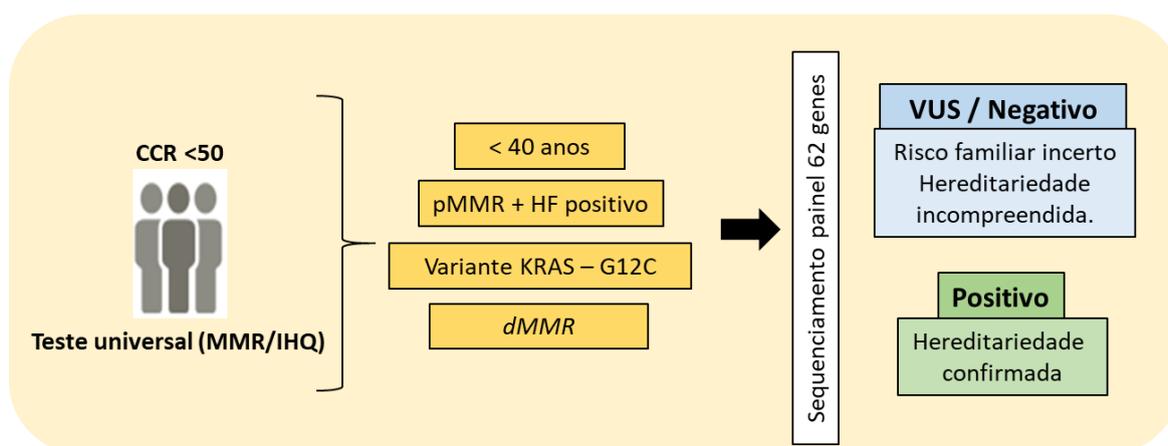
Fonte: Autoria própria.

Min - Minutos; s - Segundos; x - Quantidade de ciclos.

Os dados gerados pelo sequenciador Ion Proton foram analisados com as ferramentas Torrent Suit e Variant Caller. Os critérios para a chamada de variantes foram de cobertura mínima de 500 vezes e frequência de pelo menos 2% da base alterada.

## 5. Seleção de casos para análise genética

A seleção dos casos para a realização do sequenciamento germinativo de painel multi-genes foi realizada conforme ilustra a figura 5. Os pacientes com CCR antes dos 50 anos foram classificados de acordo com informações disponíveis em prontuário (idade, histórico familiar, IHQ das proteínas MMR, análise de mutação de *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*), além dos resultados das análises de metilação de *MLH1* e mutação em *BRAF* realizadas nesse estudo para alguns casos. A partir desses dados, selecionamos para a etapa de rastreamento de alterações germinativas os seguintes casos: 1) pacientes com tumores com deficiência no sistema MMR (dMMR); 2) casos com tumor MMR proficiente (pMMR) ou não avaliado e com história familiar positiva para CCR; 3) casos com CCR < 40 anos; 4) casos com alteração somática *KRAS*-G12C. A inclusão de grupo de pacientes com mutações somáticas *KRAS*-G12C foi realizada pois uma parcela destes pacientes pode ser portadora de variantes patogênicas em *MUTYH* (72). Para esta etapa, foi utilizado material de DNA de leucócito dos casos disponíveis em Biobanco ou foi realizada coleta prospectiva de saliva para a extração do DNA.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 5** - Esquema representativa seleção dos pacientes para avaliação de mutações germinativas. Casos com CCR desenvolvido antes dos 50 anos de idade avaliados quanto à

caracterização molecular do tumor, através de teste tumoral universal (IHQ de proteínas MMR) e avaliações adicionais quando necessário (metilação de *MLH1* e mutação somática em *BRAF*), seguido por avaliação da história familiar e avaliação para mutações germinativas que conferem predisposição a CCR (para os casos ainda não rastreados).

## 5.2 Detecção de variantes germinativas por sequenciamento de painel multi-genes

Os casos selecionados para análise germinativa foram rastreados através de sequenciamento de um painel customizado de 62 genes de predisposição ao câncer (**Figura 6**). A escolha dos genes do painel se baseou na inclusão de 27 genes associados a SPHC de diversos tumores sólidos, incluindo síndromes de CCR (*APC, ATM, BARD1, BMPR1A, BRCA1, BRCA2, BRIP1, CDH1, CDK4, CDKN2A, CHEK2, EPCAM, MLH1, MSH2, MUTYH, MSH6, NBN, PALB2, PMS2, PTEN, RAD51C, RAD51D, RET, SMARCA4, STK11, TP53* e *NF1*), 8 genes de síndromes mais raras associadas a CCR (*AXIN2, BLM, GREM1/SCG5, NTHL1, POLD1, POLE* e *SMAD4*) e 27 genes candidatos para aumento de risco de CCR recentemente descritos (*BRF1, BUB1, BUB1B, BUB3, CDKN1B, CTNNA1, ENG, EPHX1, ERCC6, EXO1, FAN1, FOCAD, GALNT12, LRP6, MIA3, MLH3, MSH3, NFKBIZ, POLQ, PTPRJ, RNF43, RPS20, SEMA4A, SETD6, SMAD9, WRN* e *XRCC4*)<sup>20, 21</sup>.

Para a construção da biblioteca e enriquecimento dos genes de interesse, o DNA genômico foi fragmentado por digestão enzimática e ligado a adaptadores e *barcodes* específicos com o kit QIAseq FX DNA Library Kit (Qiagen), conforme protocolo do fabricante. A captura das regiões alvo foi realizada através de hibridização com sondas biotinizadas, utilizando um painel customizado de 62 genes (xGen Gene Capture Pools - IDT Technologies) (**Figura 5**), seguindo as recomendações do fabricante.

O sequenciamento foi realizado na plataforma NextSeq 500 (Illumina), visando obter uma cobertura mínima de 30X para as bases alvo.

Painel multigênico				
<i>APC</i>	<i>CDH1</i>	<i>GALNT12</i>	<i>NTHL1</i>	<i>SCG5</i>
<i>ATM</i>	<i>CDK4</i>	<i>GREM1</i>	<i>PALB2</i>	<i>SEMA4A</i>
<i>AXIN2</i>	<i>CDKN1B</i>	<i>LRP6</i>	<i>PMS2</i>	<i>SETD6</i>
<i>BARD1</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>MIA3</i>	<i>POLD1</i>	<i>SMAD4</i>
<i>BLM</i>	<i>CHEK2</i>	<i>MLH1</i>	<i>POLE</i>	<i>SMAD9</i>
<i>BMPR1A</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>MLH3</i>	<i>POLQ</i>	<i>SMARCA4</i>
<i>BRCA1</i>	<i>ENG</i>	<i>MSH2</i>	<i>PTEN</i>	<i>STK11</i>
<i>BRCA2</i>	<i>EPCAM</i>	<i>MSH3#</i>	<i>PTPRJ</i>	<i>TP53</i>
<i>BRF1</i>	<i>EPHX1</i>	<i>MSH6</i>	<i>RAD51C</i>	<i>WRN</i>
<i>BRIP1</i>	<i>ERCC6</i>	<i>MUTYH*</i>	<i>RAD51D</i>	<i>XRCC4</i>
<i>BUB1</i>	<i>EXO1</i>	<i>NBN</i>	<i>RET</i>	
<i>BUB1B</i>	<i>FAN1</i>	<i>NF1</i>	<i>RNF43</i>	
<i>BUB3</i>	<i>FOCAD</i>	<i>NFKBIZ</i>	<i>RPS20</i>	

-  Evidência definitiva/forte para predisposição hereditária ao câncer colorretal;
-  Evidência moderada para predisposição hereditária ao câncer colorretal.
-  Evidência limitada para predisposição hereditária ao câncer colorretal.

Fonte: Autoria própria.

**Figura 6** - Painel customizado com 62 genes de predisposição ao câncer. O nível de evidência de associação dos genes com predisposição ao CCR foi baseado no trabalho de Seifert et al. 2019. Os genes sem coloração não foram avaliados quanto a sua relação com o risco de CCR nesse estudo. \**MUTYH*: gene com evidência definitiva para herança recessiva e moderada para herança dominante; #*MSH3*: gene com evidência moderada para herança recessiva e limitada para herança dominante.

## 6. Análises de bioinformática e seleção de variantes

As análises de bioinformática e a interpretação das variantes encontradas no sequenciamento do painel de genes foram realizadas seguindo os protocolos adotados no Laboratório de Genômica Clínica e Funcional e Laboratório de Diagnóstico Genômico. Em resumo, a ferramenta Isaac Enrichment v2.1, disponível no aplicativo Base Space (Illumina), foi utilizada para realizar o alinhamento e as chamadas variantes. As variantes identificadas foram anotadas e filtradas no software VarSeq (Golden Helix).

Foram aplicados filtros específicos para seleção de variantes germinativas raras (Qualidade  $\geq 30$ , cobertura da base  $\geq 20X$ , frequência do alelo variante  $\geq 0,25$ , frequência do alelo menor [MAF]  $\leq 0,02$  ou ausente nos bancos de dados populacionais [ExAC, ESP, 1000genomes e ABraOM]). Foram selecionadas apenas variantes em regiões codificantes ou em regiões adjacentes aos limites éxon-ínton (até 10pb intrônicos). A análise de alterações de número de cópias (CNV de *copy number variation*) foi realizada através do software VarSeq (Golden Helix). Resumidamente, o algoritmo de chamada de CNV do Varseq realiza uma avaliação comparativa da cobertura normalizada das regiões alvo entre as amostras caso e amostras controle, para identificar regiões de menor cobertura (deleções) e maior cobertura (duplicações). Foram utilizados parâmetros padrão do software para uma chamada estridente de CNVs, em que a variação da cobertura da região deve ter Z-score maior que 3 (duplicações) ou menor que -3 (deleções).

### 6.1 Classificação de variantes segundo os critérios sugeridos pelo *American College of Medical Genetics (ACMG)*

As variantes detectadas no estudo foram avaliadas quanto à sua classificação em bancos de dados de classificação clínica de variantes (ClinVar, LOVD, Insight) e em classificadores automáticos (Varsome e Franklin Genoox). As informações das variantes coletadas nessas ferramentas foram utilizadas para classificar as variantes segundo os critérios sugeridos pelo *American College of Medical Genetics (ACMG)* (Richards et al. 2015).

A *American College of Medical Genetics (ACMG)* definiu diretrizes para a

classificação de variantes germinativas em genes associados a doenças mendelianas de acordo com o grau de patogenicidade aferido por uma série de critérios. Atualmente esses critérios são divididos em duas categorias de acordo com sua probabilidade de patogenicidade: 1 - Classificação de variantes como patogênicas (P) ou provavelmente patogênicas (PP); 2 - Classificação de variantes como benignas (B) ou provavelmente benignas (PB). Os critérios que indicam patogenicidade são divididos em quatro subgrupos: PVS1 (Muito forte), PS1-4 (Forte), PM1- 5 (Moderado) e PP1-5 (Suporte). Enquanto os critérios para benignidade são divididos em 3 subgrupos: BSA1 (*stand alone*), BS1-4 (Forte) e BP1-6 (Suporte). Variantes que não alcançam a pontuação para nenhuma dessas categorias (P/PP ou B/PB), ou possuem classificação conflitantes entre elas e que não há evidência científica suficiente para assim classificá-las, são categorizadas como variantes de significado clínico desconhecido ou incerto, comumente conhecidas como VUS (73). No quadro 4 e 5, apresentamos um resumo das diretrizes da ACMG presentes no artigo de Richards (73), o qual detalha os critérios citados acima e como são utilizados como evidências de patogenicidade/benignidade.

**Quadro 4** - Critérios para classificar variantes como patogênicas.

Evidências de Patogenicidade	Categorias
<b>Muito Forte</b>	<b>PVS1</b> – Variante Nula (Sem sentido, <i>frameshift</i> , sítios canônicos de <i>splice</i> $\pm 1$ ou 2, códon de iniciação, deleção de único ou multi-éxons) em um gene onde LOF ( <i>loss of function</i> – perda de função) é um mecanismo conhecido de doença.
<b>Forte</b>	<b>PS1</b> – Mudança de um mesmo aminoácido que uma variante patogênica previamente estabelecida, independente da mudança do nucleotídeo. <b>PS2</b> - De novo (Maternidade e paternidade confirmadas), em um paciente com doença e sem histórico familiar. <b>PS3</b> – Estudos funcionais <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> bem estabelecidos que suportam o efeito prejudicial no gene ou produto gênico. <b>PS4</b> – A prevalência da variante em indivíduos afetados é significativamente aumentada em comparação com a prevalência nos controles.
<b>Moderado</b>	<b>PM1</b> – Localizado em um hot spot mutacional e/ou domínio funcional bem estabelecido e crítico (por exemplo, local ativo de uma enzima), sem uma variação benigna. <b>PM2</b> – Ausência de controles (ou em frequência extremamente baixa se recessiva), no projeto de sequenciamento do exoma, projeto 1000

	<p>genomas ou consórcio de agregação do exoma (Exome aggregation consortium – ExAC).</p> <p><b>PM3</b> – Para desordens recessivas detectadas em trans com uma variante patogênica. Nota: Isso requer teste dos pais (ou filhos) para determinar a fase.</p> <p><b>PM4</b> – O tamanho da proteína muda como resultado de deleções e inserções no quadro em uma região não repetida ou variantes stop loss.</p> <p><b>PM5</b> – Nova variante missense em um aminoácido onde, uma alteração missense diferente já havia sido previamente determinada como patogênica. Exemplo: Arg156His é patogênico; agora Arg156Cys.</p> <p><b>PM6</b> – De novo, mas sem confirmação de paternidade e maternidade.</p>
<b>Suporte</b>	<p><b>PP1</b> – Co-segregação, vários membros da família afetados com doença em um gene definitivamente conhecido por causar a doença. Nota: Pode ser usado como forte evidência com o aumento dos dados de segregação.</p> <p><b>PP2</b> – Variantes missenses em um gene com baixa taxa de variante benigna e em que as variantes patogênicas são um mecanismo comum de doença.</p> <p><b>PP3</b> – Múltiplas linhas de evidência computacional suportam um efeito deletério no gene ou no produto gênico (conservação, evolução e impacto no sítio de splicing).</p> <p><b>PP4</b> – O fenótipo do paciente ou a história familiar é altamente específica para uma doença com uma única etiologia genética.</p> <p><b>PP5</b> – Fonte respeitável recentemente relatou a variante como patogênica, mas a evidência não está disponível para uma avaliação independente.</p>

**Quadro 5** - Critérios para classificar variantes como benignas.

<b>Evidências de Benignidade</b>	<b>Categorias</b>
<b>Stand-alone</b>	<b>BA1</b> – Frequência alélica é > 5% no projeto de sequenciamento de exoma, projeto de 1000 genomas ou Consórcio de agregação de Exoma (ExAC).
<b>Forte</b>	<p><b>BS1</b> - A frequência alélica é maior do que o esperado para o transtorno;</p> <p><b>BS2</b> - Observado em um indivíduo adulto saudável para um transtorno recessivo (homozigoto), dominante (heterozigoto) ou ligado ao X (hemizigoto), com penetrância total esperada em idade precoce;</p> <p><b>BS3</b> - Estudos funcionais in vitro ou in vivo bem estabelecidos não mostram nenhum efeito prejudicial na função da proteína ou splicing;</p> <p><b>BS4</b> - Falta de segregação em membros afetados de uma família</p>
<b>Suporte</b>	<b>BP1</b> - Variante sem sentido em um gene para o qual se sabe que variantes principalmente truncadas causam doença;

	<p><b>BP2</b> - Observada em trans com uma variante patogênica para um gene/distúrbio dominante totalmente penetrante ou observada em cis com uma variante patogênica em qualquer padrão de herança;</p> <p><b>BP3</b> - Deleções no quadro/ inserções em uma região repetitiva sem uma função conhecida BP4 Várias linhas de evidências computacionais sugerem nenhum impacto no gene ou produto do gene (conservação, evolução, impacto de splicing, etc.);</p> <p><b>BP4</b> - pode ser usado apenas uma vez em qualquer avaliação de uma variante;</p> <p><b>BP5</b> - Variante encontrada em um caso com uma base molecular alternativa para a doença;</p> <p><b>BP6</b> - Fonte respeitável recentemente relata variante como benigna, mas a evidência não está disponível para o laboratório realizar uma avaliação independente;</p> <p><b>BP7</b> - Uma variante sinônima (silenciosa) para a qual os algoritmos de previsão de splicing não preveem impacto na sequência de consenso de emenda nem a criação de um novo sítio de emenda E o nucleotídeo não é altamente conservado.</p>
--	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

## 7. Análise estatística

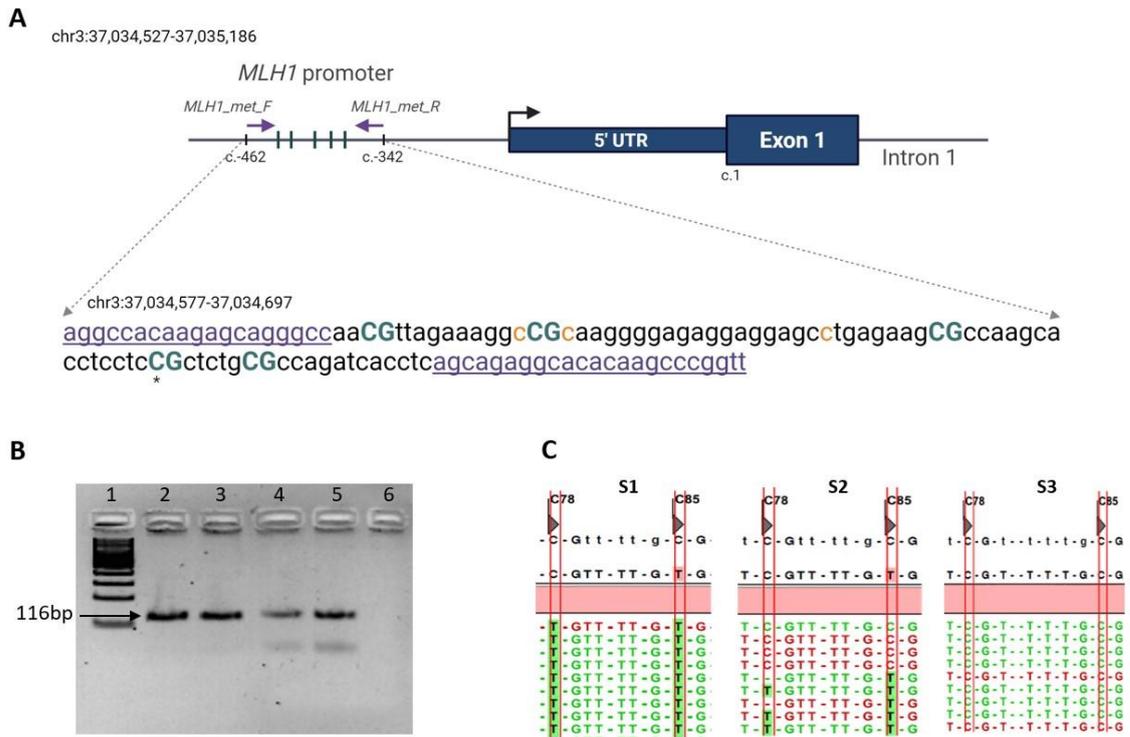
Para o teste de validação da análise de metilação de *MLH1*, foram realizadas análises estatísticas de correlação e teste T, utilizando o programa GraphPad Prism 5.0 (GraphPad). As variáveis clínicas para a coorte completa foram relatadas com estatísticas descritivas. Para as comparações dos casos com e sem alterações germinativas detectadas e suas características clínicas, histopatológicas e de história familiar, inicialmente foi realizada uma análise descritiva das variáveis, em que são apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas, e as principais medidas resumo, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, para as variáveis quantitativas. Para avaliar a associação entre variáveis qualitativas, foi utilizado o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher, quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5%. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software IBM SPSS versão 28.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Validação de um teste NGS baseado em *amplicon* para avaliar a metilação do promotor *MLH1* e sua correlação com mutação em *BRAF* em pacientes com câncer colorretal.

A primeira etapa deste estudo baseou-se no desenvolvimento de uma metodologia baseada em NGS para avaliar o status de metilação do promotor do gene *MLH1* em tecido tumoral. Essa ferramenta foi desenvolvida para, em conjunto com a avaliação de mutação em *BRAF*, identificar o subgrupo de pacientes com perda de expressão de *MLH1/PMS2* correlacionados a causas esporádicas de desenvolvimento do câncer colorretal. Os resultados desse objetivo foram submetidos em um artigo científico à revista *Experimental and Molecular Pathology* (**Anexo 2**) e está atualmente na segunda rodada de revisão por pares.

Para avaliar a metilação de *MLH1*, desenhamos primers específicos para amplificar uma região de 121 pares de bases do promotor do gene que apresenta cinco dinucleotídeos CpGs, dos quais quatro foram considerados para análise de metilação (**Figura 7A**). Após padronizar a reação de PCR, avaliamos a amplificação da região promotora de *MLH1* em géis de agarose, antes do sequenciamento (**Figura 7B**). As frequências das bases C e T dos quatro CpGs e três citosinas de controle (não CpGs) foram obtidas através do mapeamento de leituras de sequenciamento na ferramenta CLC Genomics Workbench (**Figura 7C**).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 7 – (A):** Região promotora de *MLH1* e CpGs avaliados. Representação da região genômica contendo a região do promotor de *MLH1* analisado. Os iniciadores estão representados em roxo, o dinucleotídeo CpG está representado em verde. Um asterisco indica o CpG excluído da análise devido ao alto desvio de metilação. As citosinas de controle estão representadas em laranja. As posições dos cromossomos referem-se à referência Hg19. **(B):** Amplificação do promotor de *MLH1*. Gel de agarose (2%) mostrando o padrão de amplificação de um fragmento de 116pb englobando a região promotora do gene *MLH1* (1) Ladder (marcador de peso molecular); (2,3) amostra de DNA de saliva; (4,5) Amostras de DNA parafinado; (6) Controle negativo. **(C):** Análise de metilação do promotor de *MLH1*. Mapeamento de sequenciamento em CLC Genomics WorkBench 6: S1) amostra com CpGs não metilados; S2) amostra com CpGs parcialmente metilados; S3) com CpGs totalmente metilados.

Para demonstrar a especificidade da análise de metilação de *MLH1*, testamos DNA de 20 amostras de saliva e 26 amostras de tumor com dados imuno-histoquímicos mostrando perda de *MLH1*/*PMS2* (20 casos) ou *MSH2*/*MSH6* (6 casos) (**Figura 8A**). A porcentagem média de citosinas não convertidas nas bases controle foi de 0,6% (+0,2%), confirmando a alta eficiência de conversão de bissulfito. A porcentagem média de metilação

de *MLH1* nas amostras de saliva foi de 2,49% (0,5% a 6,4%) e definiu o ponto de corte de 10% para considerar uma amostra como metilada. Em tumores com perda de *MSH2/MSH6*, a taxa de metilação de *MLH1* variou de 0,7% a 4,6% (média de 2,1%) e em tumores com perda de expressão de *MLH1/PMS2* de 1,0% a 91,3% (média de 29,6%). Somente neste último grupo detectamos amostras acima do cut-off de 10% e que foram consideradas positivas para metilação de *MLH1*.

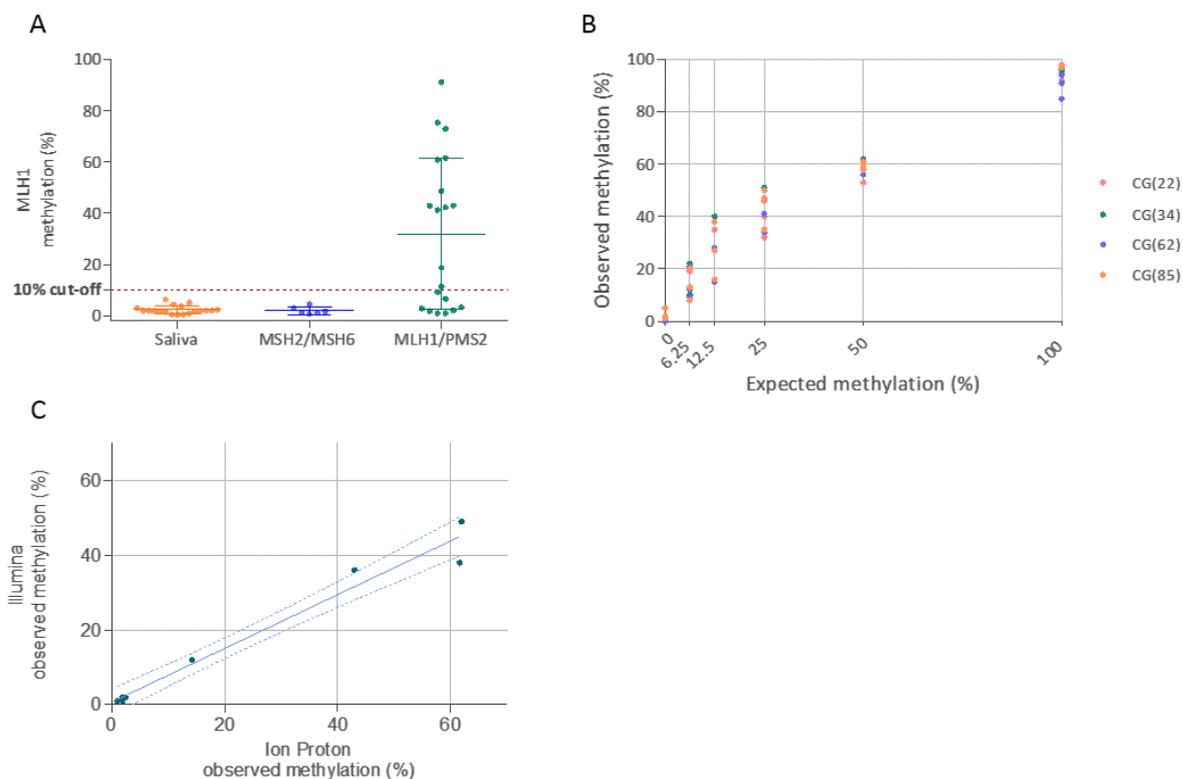
Para verificar a reprodutibilidade e precisão da análise do promotor *MLH1*, realizamos uma análise de diluição em série e uma comparação dos resultados entre duas plataformas de sequenciamento de última geração. Primeiro, no experimento de diluição em série, usamos DNAs de linhagens celulares humanas comerciais completamente metilados e completamente não metilados e geramos seis amostras com diferentes porcentagens de metilação esperada (100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25% e 0%) (**Figura 8B, Tabela 5**). A amplificação do alvo e a construção da biblioteca foram realizadas em triplicata e o sequenciamento foi realizado na plataforma Ion Proton. Com exceção da amostra com metilação esperada de 100%, todas as outras amostras apresentaram uma taxa média de metilação observada acima do esperado, com a maior diferença entre o esperado versus o observado aparecendo nas diluições de 25% e 12,5%. O desvio padrão (DP) variou de 1% a 11,2% entre as replicatas, sendo o maior desvio observado em diluições com metilação esperada de 25% (DP +7,9%) e 12,5% (DP +11,2%).

**Tabela 5** - Diluição seriada e análise de reprodutibilidade.

	Diluições					
Metilação Esperada (%)	<b>100.0%</b>	<b>50.0%</b>	<b>25.0%</b>	<b>12.5%</b>	<b>6.25%</b>	<b>0.0%</b>
Replicata 1	90.6%	59.3%	33.9%	15.2%	8.8%	1.6%
Replicata 2	93.8%	57.2%	49.5%	37.6%	20.5%	1.1%
Replicata 3	95.8%	58.9%	43.4%	27.0%	12.5%	3.0%
Média (± SD)	93.4%	58.5%	42.3%	26.6%	13.9%	1.9%
	(±2.6%)	(±1.1%)	(±7.9%)	(±11.2%)	(±6.0%)	(±1.0%)
Diferença esperado-observado	6.6%	-8.5%	-17.3%	-14.1%	-7.7%	-1.9%

**Fonte:** Autoria própria.

Na análise comparativa entre as duas plataformas NGS, Ion Proton e Illumina, foram avaliadas 9 amostras com taxas de metilação variando de 1% a 62%. As porcentagens de metilação obtidas pela plataforma Illumina foram ligeiramente inferiores às obtidas pela plataforma Ion Proton (**Figura 8C**), mas houve alta correlação geral entre as plataformas ( $r = 0,97$ ).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 8 - (A):** Análise de metilação de *MLH1* em amostras de saliva e tumor. Todas as amostras esperadas de serem negativas (salivas e tumores deficientes para *MSH2/MSH6*) apresentaram níveis de metilação de *MLH1* abaixo do ponto de corte de 10%, enquanto uma proporção de tumores deficientes em *MLH1/PMS2* foi positiva para metilação de *MLH1*. **(B):** Diluição seriada e análise de reprodutibilidade. Os resultados demonstram resultados proporcionais e reprodutíveis em todas as réplicas, com menor variação em níveis mais altos de metilação. **(C):** Comparação dos níveis de metilação entre plataformas NGS. Os sequenciadores Ion Proton e Illumina mostraram uma alta concordância entre Taxas de metilação de *MLH1* ( $r = 0,97$ ).

## 8.2 Correlação da metilação de *MLH1*, perda de expressão de *MLH1/PMS2* e status de mutação *BRAF*

A análise de metilação no promotor *MLH1* foi realizada com vinte amostras de tumor com perda de expressão de *MLH1/PMS2* (Tabela 6). Doze amostras apresentaram metilação positiva em *MLH1* com porcentagem de metilação variando de 11,5% a 91,30% e oito casos não foram metilados. A mutação V600E *BRAF* foi detectada em dez casos, todos eles *MLH1*-metilados, enquanto dez casos eram do tipo selvagem para *BRAF* V600.

A presença de metilação de *MLH1* e mutação *BRAF* concordou em dez casos e a ausência de ambas as alterações concordou em oito casos, dada uma concordância geral de 90% (18/20). Dois casos mostraram ausência de mutação *BRAF* e presença de metilação de *MLH1* (ID10M e ID20M). Curiosamente, um dos casos (ID20M) apresentou uma variante patogênica germinativa (VP) no gene *MLH1* (deleção dos éxons 17-19), enquanto o segundo paciente (ID10M) apresentou um VP em *MUTYH* (monoalélico).

Para 6 de 8 pacientes que foram negativos para metilação de *MLH1* e mutação *BRAF*, tivemos resultados de testes genéticos germinativos realizados nesse estudo (resultados completos descritos no item 8.3). Cinquenta por cento (3/6) desses pacientes foram diagnosticados com SL com uma VP germinativa no gene *MLH1*. Um paciente (ID27M) que foi negativo no teste germinativo realizou teste genômico somático abrangente e foi confirmado como um paciente Lynch-like, devido à detecção de uma variante somática de perda de função em *MLH1* (c.991G>T; p.Glu331Ter - frequência da variante: 59%). Pacientes duplamente negativos (*MLH1* não metilado/ *BRAF* WT) tiveram uma idade de início do CCR mais precoce quando comparados aos pacientes duplamente positivos (41,1 versus 63,5, p=0,001). De maneira interessante, no grupo de pacientes com CCR acima de 50 somente 1 paciente foi duplamente negativo (11,1%, 1/9), enquanto no grupo de pacientes abaixo de 50 anos, 81,8% foram duplamente negativos ou apresentaram discordância entre os marcadores (9/11).

**Tabela 6** - Análise da metilação do promotor *MLH1* e mutação *BRAF V600E* em tumores com perda em *MLH1/PMS2*.

Amostras	Idade de início	Celularidade tumoral (%)	Metilação <i>MLH1</i> (%)	Mutação <i>BRAF</i>	Concordância <i>MLH1</i> met / <i>BRAF</i> mut	Análise Germinativa
IDm 01	86	80%	73,0%	V600E	Sim	NA
IDm 02	65	70%	41,3%	V600E	Sim	NA
IDm 03	61	65%	43,0%	V600E	Sim	NA
IDm 04	81	70%	48,8%	V600E	Sim	NA
IDm 05	61	80%	60,9%	V600E	Sim	NA
IDm 06	65	70%	42,3%	V600E	Sim	NA
IDm 07	65	90%	91,3%	V600E	Sim	NA
IDm 08	61	65%	43,0%	V600E	Sim	NA
IDm 12	45	95%	61,6%	V600E	Sim	NA
IDm19	45	95%	75,4%	V600E	Sim	NA
IDm 11	36	80%	Não metilado	WT	Sim	<i>MLH1path</i>
IDm 13	47	60%	Não metilado	WT	Sim	<i>MLH1path</i>
IDm 23	44	90%	Não metilado	WT	Sim	<i>MLH1path</i>
IDm 14	44	85%	Não metilado	WT	Sim	Negativo
IDm 26	35	70%	Não metilado	WT	Sim	Negativo
IDm 27 <sup>a</sup>	26	60%	Não metilado	WT	Sim	Negativo
IDm 09	63	30%	Não metilado	WT	Sim	NA
IDm 17 <sup>b</sup>	34	80%	Não metilado	WT	Sim	NA
IDm 10	<b>46</b>	<b>80%</b>	<b>18,8%</b>	<b>WT</b>	<b>Não</b>	<b><i>MUTYHpath</i><sup>c</sup></b>
IDm 20	<b>47</b>	<b>90%</b>	<b>11,5%</b>	<b>WT</b>	<b>Não</b>	<b><i>MLH1path</i></b>

Fonte: Autoria própria.

IHQ: imuno-histoquímica; WT: tipo selvagem; NA: não avaliado; path: patogênico. *MLH1path*: mutação somática em *MLH1* (*Lynch-like*); *MUTYHpath*: Portador de variante monoalélica em *MUTYH*.

### 8.3 Casuística e pacientes selecionados para sequenciamento de Painel Multigênico

Foram identificados 376 pacientes diagnosticados com câncer colorretal com idade abaixo de 50 anos. Os prontuários eletrônicos desses pacientes foram avaliados para coleta de dados clínicos como: idade ao diagnóstico, histologia, presença de outros tumores, histórico familiar de neoplasias e diagnóstico genético prévio.

Dos 376 pacientes, 255/376 (67,8%) apresentavam resultado do teste tumoral universal por IHQ de MMR, sendo que 229/255 (89,8%) foram positivos (pMMR) e 26/255 (10,2%) pacientes negativos (dMMR) (**Tabela 7**). Dos pacientes dMMR, 14/26 (53,8%) apresentaram deficiência em MLH1 e/ou PMS2 (13 MLH1/PMS2 negativos e 1 PMS2 negativo) e 12 (46,1%) apresentaram deficiência em MSH2 e/ou MSH6 (9 MSH2/MSH6 negativos e 3 MSH6 negativos).

Em relação às mutações somáticas nos genes *KRAS*, *NRAS* e *BRAF*, 174 pacientes apresentavam resultado de avaliação de mutação, desses, 87 apresentaram mutação em pelo menos 1 gene, a maioria deles em *KRAS/NRAS* (85/184 – 46,2%) e 87 (87/184 – 47,3%) eram selvagens. Dos 45 (45/184 – 24,4%) pacientes com resultado de avaliação de *BRAF*, apenas 3 (3/184 – 1,6%) pacientes foram positivos para mutação, sendo 2 com a mutação V600E e 1 V600L. Duzentos e dois dos 376 pacientes (202/376 – 53,7%) não possuíam ou não foi relatado a realização de teste tumoral.

A grande maioria dos pacientes 275/376 (73%) relatou não possuir histórico familiar de CCR. 29/376 (7,7%) dos pacientes apresentam pelo menos um parente de 1º grau com CCR, 50/376 (13,3%) pacientes apresentam parentes de 2º grau com CCR e 18/376 (4,8%) pacientes se enquadram nos critérios de Amsterdam I/II (**Tabela 7**). Dos 376 pacientes elegíveis neste estudo, 172 possuíam material de DNA de leucócito disponível no Biobanco da instituição.

**Tabela 7** - Dados clínicos dos 376 pacientes com CCR abaixo de 50 anos.

Característica	Tipo	Número (%)
Pacientes com CCR <50	Homens	189 (50,3%)
	Mulheres	187 (49,7%)
Expressão MMR	Não realizado	121 (32,2%)
	Realizado:	255 (67,8%)
	Proficiente	229 (89,8%)
	MLH1/PMS2 (ambos ou isolados)	14 (5,5%)
	MSH2/MSH6 (ambos ou isolados)	12 (4,7%)
Mutações Somáticas RAS/BRAF	Não realizado	202 (53,7%)
	Realizado:	174 (46,3%)
	<i>BRAF</i> mutado	3 (1,6%)
	<i>KRAS/NRAS/BRAF selvagem</i>	87 (47,3%)
	<i>KRAS/NRAS</i> mutado	85 (46,2%)
Histórico Familiar	1 parente de primeiro grau com CCR	292 (7,7%)
	1 parente de segundo grau com CCR	50 (13,3%)
	Amsterdã	18 (4,8%)
	Sem histórico familiar	275 (73,1%)
	Não descrito	4 (1%)
Leucócitos Biobanco		172
Pacientes recrutados		37

Fonte: Autoria própria.

CCR: Câncer colorretal; MMR: *Mismatch repair*.

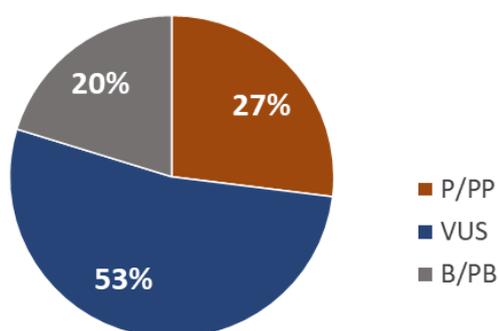
#### 8.4 Análise de variantes germinativas por sequenciamento de painel multi-genes

Dos 376 pacientes do estudo, 193 preenchem os critérios para a realização da etapa de análise germinativa (conforme detalhado no delineamento experimental do estudo na **Figura 4**). Foi possível obter amostras germinativas (leucócito e saliva) de 89 pacientes, sendo 52 amostras retrospectivas armazenadas obtidas no Biobanco da instituição e 37 coletadas prospectivamente em colaboração com o Departamento de Oncogenética.

Foi realizado o sequenciamento do painel multi-gênico com 62 genes e a avaliação

de variantes germinativas em 89 casos selecionados. As variantes identificadas foram filtradas conforme descrito no **item 6.1** e classificadas segundo os critérios sugeridos pelo ACMG. Em 24 (27%) pacientes foram detectadas variantes patogênicas ou provavelmente patogênicas (P/PP) (**Tabela 8**). Em 47 (53%) pacientes foram detectadas apenas variantes de significado incerto (VUS) (**Tabela 9**) e 18 (20%) pacientes apresentaram apenas variantes sem significado clínico para os 62 genes avaliados (**Figura 9**).

### Resultado painel 62 genes

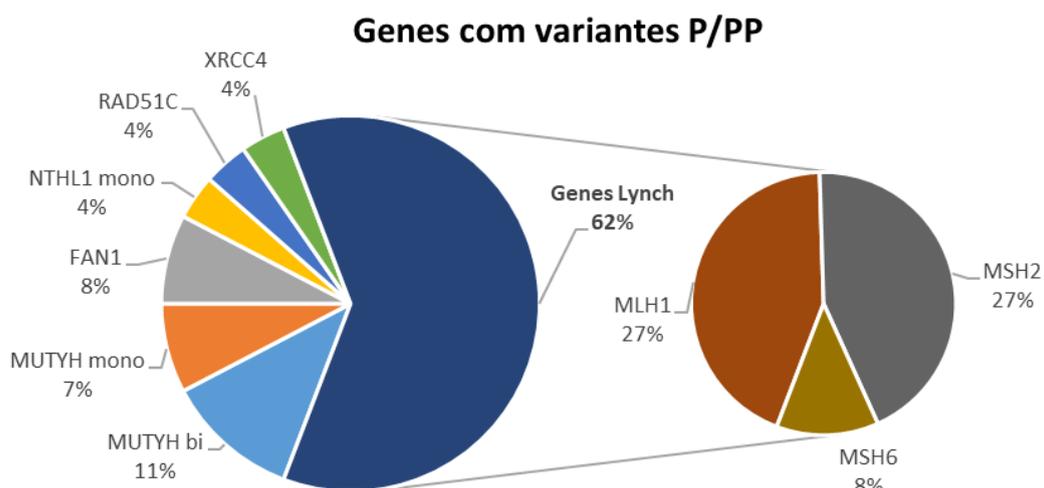


**Fonte:** Autoria própria.

**Figura 9** - Porcentagem de variantes encontradas em 89 paciente que fizeram sequenciamento de painel germinativo multi-gênico. VUS: variantes de significado clínico incerto; P/PP: patogênica/provavelmente patogênica; B/PB: benigna/provavelmente benigna.

Dos 24 pacientes com variantes patogênicas, 16 (66,6%) apresentaram variantes P/PP em genes da síndrome de Lynch. Estes casos apresentaram 7 (43,7%) variantes em *MLH1* (sendo 2 pacientes com a mesma CNV envolvendo a deleção dos éxons 17 a 19), 7 (43,7%) possuíam alteração em *MSH2* e 2 (12,5%) apresentaram variantes em *MSH6*. Cinco pacientes (20%) apresentaram variantes P/PP em *MUTYH*, 2 deles com duas variantes em heterozigose e 1 deles com 1 variante em homozigose, sendo, portanto, portadores bialélicos, e 2 com 1 variante em heterozigose (monoalélico). Dois (8,3%) pacientes tinham variantes PP em *FAN1* (**Tabela 8**). Um paciente apresentou uma variante PP em *NTHL1* (monoalélico), um paciente apresentou uma variante PP em *RAD51C* e um paciente apresentou uma variante P em *XRCC4* (monoalélico). Dois pacientes apresentaram variantes

P/PP em mais de 1 gene (1 *MLH1* com *FAN1*, 1 *MUTYH* com *XRCC4*) (**Figura 10 e Tabela 8**). Em 47 (53%) pacientes foram detectadas apenas variantes de significado incerto (VUS) (**Tabela 9**) e 18 (20%) pacientes não apresentaram variantes com significado clínico (negativos) para os 62 genes avaliados.



Fonte: Autoria própria.

**Figura 10.** Porcentagem das variantes patogênicas encontradas em 8 genes em 24 pacientes.

P/PP: patogênica/provavelmente patogênica.

**Tabela 8** - Descrição de dados clínicos e variantes P e PP detectadas em 24 pacientes.

ID	Idade CCR	Sexo	Status MMR	Status <i>RAS/BRAF</i>	Metilação <i>MLH1</i>	História familiar	Gene	Variantes*	Classificação ACMG
ID_05	46	F	Perda <i>MLH1/PMS2</i>	WT	Met	1 Parente de 1º grau com CCR	<i>MUTYH</i>	c.536A>G; p.Tyr179Cys	P
ID_06	44	F	pMMR	<i>KRAS</i> (G13D)	Nr	1 Parente de 1º grau com CCR	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A; p.Gly396Asp	P
							<i>XRCC4</i>	c.25delC; p.His9Thrfs*8	P
ID_07	47	F	Perda <i>MLH1/PMS2</i>	WT	Não Metilado	Sem história familiar	<i>MLH1</i>	c.143A>C; p.Gln48Pro	PP
ID_18	41	M	Perda <i>MSH2/MSH6</i>	<i>KRAS</i> (G12D)	Nr	Amsterdam	<i>MSH2</i>	c.1700_1704delAAACA; p.Lys567Argfs*3	P
ID_24	47	F	Perda <i>MLH1/PMS2</i>	WT	Met	1 Parente de 1º grau com CCR	<i>MLH1</i>	CNV - Deleção dos éxons 17-19	P
							<i>FAN1</i>	c.1571delT; p.Leu524Ter	PP
ID_32	40	F	Perda <i>MSH2/MSH6</i>	Nr	Nr	Sem história familiar	<i>MSH2</i>	c.1823T>C; p.Phe608Ser	P
ID_38	46	M	Perda <i>MLH1/PMS2</i>	Nr	Nr	Amsterdam	<i>MLH1</i>	CNV - Deleção dos éxons 17-19	P
ID_39	46	M	Perda <i>MSH6</i>	Nr	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>MSH6</i>	c.3103C>T; p.Arg1035Ter	P
ID_42	37	M	Perda <i>MSH2/MSH6</i>	<i>KRAS</i> (G13D)	Nr	Sem história familiar	<i>MSH2</i>	c.942+3A>T	P
ID_43	25	M	Perda <i>MSH6</i>	Selvagem	Nr	Sem história familiar	<i>MSH6</i>	c.1767delT; p.Pro591fs	P
ID_49	37	M	Perda <i>MSH2/MSH6</i>	WT	Não Metilado	1 Parente de 1º grau com CCR	<i>MSH2</i>	c.1046C>G; p.Pro349Arg	P
ID_50	44	F	Perda	WT	Não Metilado	1 Parente de	<i>MLH1</i>	c.2141G>A; p.Trp714Ter	P

			MLH1/PMS2			2º grau com CCR			
ID_56	28	M	pMMR	WT	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>RAD51C</i>	c.905-2_905-1delAG	P
ID_58	31	M	Nr	Nr	Nr	Amsterdam	<i>MSH2</i>	c.1968C>G;p.Tyr656Ter	P
ID_61	32	F	pMMR	<i>KRAS</i> (G12C)	Nr	Sem história familiar	<i>MUTYH</i>	c.902C>G;p.Pro301Arg	PP
							<i>MUTYH</i>	c.536A>G; p.Tyr179Cys	P
ID_64	44	F	pMMR	<i>KRAS</i> (G12C)	Nr	Amsterdam	<i>MUTYH</i>	CNV- Deleção dos éxons 4 - 16 <sup>(HM)</sup>	P
ID_67	48	M	Perda MSH2/MSH6	<i>KRAS</i> (G12D)	Não Metilado	Sem história familiar	<i>MSH2</i>	c.1613delA;p.Asn538Thrfs*5	P
ID_72	46	M	Nr	Nr	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>MLH1</i>	c.1276C>T;p.Gln426Ter	P
ID_73	44	M	Nr	Nr	Nr	Amsterdam	<i>MLH1</i>	c.83C>T;p.Pro28Leu	P
ID_77	33	F	Nr	Nr	Nr	1 Parente de 1º grau com CCR	<i>MLH1</i>	c.2038T>C;p.Cys680Arg	P
ID_78	44	M	pMMR	WT	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>FAN1</i>	c.34dupA;p.Arg12Lysfs*4	PP
ID_85	45	M	pMMR	WT	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>MSH2</i>	c.2211-1G>C	PP
ID_86	40	F	pMMR	WT	Nr	1 Parente de 2º grau com CCR	<i>NTHL1</i>	c.115+1G>A	PP
ID_90	50	M	pMMR	<i>KRAS</i> (G12C)	Nr	Sem história familiar	<i>MUTYH</i>	c.1187G>A;p.Gly396Asp	P
							<i>MUTYH</i>	c.933+3A>C	P

Fonte: Autoria própria.

CCR – câncer colorretal; F – feminino; M – masculino; pMMR – proteínas MMR proficientes; P – patogênica; PP – provavelmente patogênica; WT – selvagem; Met – metilado; 0 – Sem histórico familiar; 1 – pelo menos um parente de primeiro grau com CCR; 2 - pelo menos um parente de segundo grau com CCR; 3 – Critérios de Amsterdam. \*Todas as variantes detectadas são heterozigotas, exceto a do caso ID\_64.

**Tabela 9** - Características das variantes P, PP e VUS detectados em 71 pacientes através do sequenciamento do painel customizado de 62 genes.

ID	Gene	Tipo da variante	RefSeq (NM)	Códon alterado	Aminoácido alterado	VAF (gnomAD/ABraOM)	Classificação (ACMG)
ID_02	<i>BARD1</i>	Missense	NM_000465.3	c.1028C>T	p.Thr343Ile	0,0000 /nr	<b>VUS</b>
ID_03	<i>EPHX1</i>	Missense	NM_000120.3	c.689T>C	p.Leu230Pro	nr/nr	<b>VUS</b>
ID_04	<i>MUTYH</i>	Splice region	NM_001128425.1	c.1518+3A>T	-	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>MSH2</i>	Missense	NM_000251.2	c.716A>G	p.Gln239Arg	0.00001/nr	<b>VUS</b>
ID_05	<i>MUTYH</i>	Missense	NM_001128425.1	c.536A>G	p.Tyr179Cys	0,0016/0.002463	<b>P</b>
ID_06	<i>MUTYH</i>	Missense	NM_001128425.1	c.1187G>A	p.Gly396Asp	0,00331/0.005124	<b>P</b>
	<i>XRCC4</i>	Frameshift	NM_022406.3	c.25delC	p.His9Thrfs*8	0,00096/nr	<b>P</b>
	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.377C>T	p.Thr126Ile	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>POLQ</i>	Missense	NM_199420.3	c.7232G>C	p.Cys2411Ser	nr/nr	<b>VUS</b>
ID_07	<i>MLH1</i>	Missense	NM_000249.3	c.143A>C	p.Gln48Pro	nr/nr	<b>PP</b>
ID_09	<i>POLD1</i>	Missense	NM_002691.3	c.568G>A	p.Val190Met	0,00000/nr	<b>VUS</b>
	<i>POLD1</i>	Missense	NM_002691.3	c.973A>G	p.Ile325Val	0,0020/nr	<b>VUS</b>
ID_10	<i>MUTYH</i>	Splice site	NM_001128425.1	c.934-2A>G	-	0,00000/nr	<b>VUS</b>
	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.544G>A	p.Val182Ile	0,0001/nr	<b>VUS</b>
	<i>NTHL1</i>	Missense	NM_002528.6	c.98G>A	p.Arg346Cys	0,0009/nr	<b>VUS</b>
ID_11	<i>PTPRJ</i>	missense_variant	NM_002843.3	c.2008G>A	p.Ala670Thr	0,00006 / 0,000854	<b>VUS</b>
	<i>BRIP1</i>	missense_variant	NM_032043.2	c.3302C>G	p.Pro1101Arg	Nr	<b>VUS</b>

<b>ID_12</b>	<i>ERCC6</i>	Missense	NM_000124.3	c.3650T>G	p.Phe1217Cys	0,00073/0,00821	<b>VUS</b>
	<i>POLE</i>	Missense	NM_006231.3	c.1288G>A	p.Ala430Thr	0,0001/nr	<b>VUS</b>
	<i>AXIN2</i>	Missense	NM_004655.3	c.704C>G	p.Thr235Ser	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_13</b>	<i>POLQ</i>	Missense	NM_199420.3	c.784G>A	p.Val262Ile	0,00016/0,000427	<b>VUS</b>
<b>ID_14</b>	<i>MIA3</i>	Missense	NM_001324062.1	c.2687C>T	p.Ala896Val	0,00073/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>XRCC4</i>	Missense	NM_022406.3	c.166G>A	p.Ala56Thr	0.00051/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.4	c.325C>A	p.Leu109Ile	0,00045/nr	<b>VUS</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.7522G>A	p.Gly2508Arg	0,00003/nr	<b>VUS</b>
	<i>BRIP1</i>	Missense	NM_032043.2	c.3651G>T	p.Trp1217Cys	0,00003/0,004697	<b>VUS</b>
<b>ID_15</b>	<i>CHEK2</i>	Missense	NM_007194.3	c.1036C>T	p.Arg346Cys	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_18</b>	<i>MSH2</i>	Frameshift	NM_000251.2	c.1700_1704delAAACA	p.Lys567Argfs*3	nr/nr	<b>P</b>
	<i>POLQ</i>	Missense	NM_199420.3	c.913T>G	p.Ser305Ala	0,0018/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_22</b>	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.820G>A	p.Gly274Arg	0,0015/0,005747	<b>VUS</b>
<b>ID_23</b>	<i>CTNNA1</i>	Missense	NM_001903.4	c.1471T>C	p.Trp491Arg	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>LRP6</i>	Missense	NM_002336.2	c.2857C>A	p.Gln953Lys	0,00002/nr	<b>VUS</b>
	<i>BUB1B</i>	Missense	NM_001211.5	c.440T>C	p.Ile147Thr	0,0000/0,001642	<b>VUS</b>
<b>ID_24</b>	<i>MLH1</i>	CNV/ deleção	NM_000249.3	Del E17-E19	-	-	<b>P</b>
	<i>FAN1</i>	Stop gained	NM_014967.4	c.1571delT	p.Leu524Ter	0,00000/nr	<b>PP</b>
	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.5	c.4833G>C	p.Gln1611His	0,0000/nr	<b>VUS</b>
	<i>CDKN1B</i>	Missense	NM_004064.4	c.356T>C	p.Ile119Thr	0,0006 /0,002463	<b>VUS</b>
<b>ID_26</b>	<i>BRF1</i>	Missense	NM_001519.3	c.782G>A	p.Arg261Gln	0,0002/0,000821	<b>VUS</b>
<b>ID_27</b>	<i>MSH3</i>	Missense	NM_002439.4	c.1361G>T	p.Arg454Leu	0,00003/nr	<b>VUS</b>

ID_28	<i>MSH3</i>	Missense	NM_002439.4	c.1816A>G	p.Ser606Gly	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.4	c.370A>G	p.Ile124Val	0,00013/0,000854	<b>VUS</b>
ID_29	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.1073A>G	p.Asn358Ser	000083/0,000854	<b>VUS</b>
ID_30	<i>MSH6</i>	Missense	NM_000179.2	c.2177T>A	p.Phe726Tyr	nr/0,000427	<b>VUS</b>
ID_31	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.267G>C	p.Glu89Asp	0,0005/nr	<b>VUS</b>
	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.1268C>A	p.Ala423Glu	0,0019/nr	<b>VUS</b>
	<i>EXO1</i>	Missense	NM_006027.4	c.1364T>C	p.Phe455Ser	0,0018/nr	<b>VUS</b>
	<i>NTHL1</i>	Splice region	NM_002528.6	c.816-3C>T	-	nr/0,000821	<b>VUS</b>
	<i>STK11</i>	Missense	NM_000455.4	c.894C>A	p.Phe298Leu	0,0007/nr	<b>VUS</b>
ID_32	<i>MSH2</i>	Missense	NM_000251.2	c.1823T>C	p.Phe608Ser	nr/nr	<b>P</b>
	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.4	c.201T>G	p.Cys67Trp	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>ERCC6</i>	Missense	NM_000124.3	c.1397+8299G>A	p.Gly461Arg	0,00115/0,001708	<b>VUS</b>
	<i>PTPRJ</i>	Missense	NM_002843.3	c.1495A>G	p.Thr499Ala	0,00261/0,001281	<b>VUS</b>
	<i>AXIN2</i>	Missense	NM_004655.3	c.1637G>T	p.Gly546Val	0.00022/nr	<b>VUS</b>
ID_33	<i>SMARCA4</i>	Missense	NM_001128849.1	c.1090G>A	p.Val364Met	0,00003/nr	<b>VUS</b>
ID_34	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.5	c.6620C>T;	p.Ser2207Leu	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>WRN</i>	Missense	NM_000553.4	c.674G>A	p.Arg225Gln	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>BUB1B</i>	Missense	NM_001211.5	c.1003G>C	p.Ala335Pro	0,00041/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>PALB2</i>	Missense	NM_024675.3	c.1588C>T	p.Leu530Phe	nr/nr	<b>VUS</b>
ID_37	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.6	c.5816A>T	p.Asp1939Val	0,000007/nr	<b>VUS</b>
ID_38	<i>MLH1</i>	CNV/ deleção	NM_000249.3	Del E17-E19	-	nr/nr	<b>P</b>

	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.4	c.2818A>T	p.Met940Leu	0,00076/0,000854	<b>VUS</b>
	<i>SMAD9</i>	Missense	NM_001127217.2	c.60A>T	p.Arg20Ser	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_39</b>	<i>MSH6</i>	Stop gained	NM_000179.3	c.3103C>T	p.Arg1035Ter	nr/nr	<b>P</b>
	<i>BRF1</i>	Missense	NM_001519.4	c.391G>A	p.Val131Met	0,000007/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_42</b>	<i>MSH2</i>	Splice gain	NM_000251.2	c.942+3 <sup>a</sup>	-	-	<b>P</b>
	<i>EPCAM</i>	Missense	NM_002354.2	c.338C>T	p.Thr113Ile	0,00000795/nr	<b>VUS</b>
	<i>MSH6</i>	Missense	NM_000179.2	c.2875C>T	p.Arg959Cys	0,00006/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>BARD1</i>	Missense	NM_000465.3	c.1835A>T	p.Asp612Val	0,00003/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>NF1</i>	Missense	NM_000267.3	c.6710G>A	p.Arg2237Gln	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_43</b>	<i>MSH6</i>	Frameshift	NM_000179.2	c.1767delT	p.Pro591Glnfs*19	nr/nr	<b>P</b>
<b>ID_44</b>	<i>ERCC6</i>	Missense	NM_000124.3	c.4015T>C	p.Phe1339Leu	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>CDKN1B</i>	Missense	NM_004064.4	c.155T>G	p.Met52Arg	0,00022/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>BRIP1</i>	Missense	NM_032043.2	c.728T>C	p.Ile243Thr	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_49</b>	<i>MSH2</i>	Missense	NM_000251.2	c.1046C>G	p.Pro349Arg	nr/nr	<b>P</b>
	<i>PMS2</i>	Missense	NM_000535.6	c.2149G>A	p.Val717Met	0,00032/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.6860G>C,	p.Gly2287Ala,	000096/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>LRP6</i>	Missense	NM_002336.2	c.2203G>A	p.Asp735Asn	0,00016/0,001281	<b>VUS</b>
	<i>POLE</i>	Missense	NM_006231.3	c.139C>T	p.Arg47Trp	0,00080/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_50</b>	<i>MLH1</i>	Stop gained	NM_000249.3	c.2141G>A	p.Trp714Ter	nr/nr	<b>P</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.3240C>A	p.Asp1080Glu	nr/0,001281	<b>VUS</b>
<b>ID_51</b>	<i>MIA3</i>	Missense	NM_198551.4	c.44G>C	p.Arg15Pro	0,000007/nr	<b>VUS</b>
	<i>MLH3</i>	Missense	NM_001040108.2	c.3137G>A	p.Arg1046Gln	0,000178/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_53</b>	<i>MSH3</i>	Missense	NM_002439.4	c.1327G>A	p.Ala443Thr	nr/nr	<b>VUS</b>

	<i>BMPR1A</i>	Missense	NM_004329.2	c.991C>G	p.Leu331Val	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>SCG5</i>	Missense	NM_001144757.2	c.335G>A	p.Gly112Glu	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_54</b>	<i>NFKBIZ</i>	Missense	NM_031419.3	c.1634T>C	p.Leu545Pro	0,00035/0,000854	<b>VUS</b>
<b>ID_55</b>	<i>RNF43</i>	Missense	NM_017763.5	2257G>A	p.Glu753Lys	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_56</b>	<i>RAD51C</i>	Splice site	NM_058216.2	c.905-2_905-1delAG	-	nr/nr	<b>PP</b>
<b>ID_58</b>	<i>MSH2</i>	Missense	NM_000251.2	c.1968C>G	p.Tyr656Ter	nr/nr	<b>P</b>
	<i>BRCA1</i>	Missense	NM_007294.3	c.754C>T	p.Arg252Cys	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>BRIP1</i>	Missense	NM_032043.2	c.415T>G	p.Ser139Ala	0,00003/0000427	<b>VUS</b>
	<i>CHEK2</i>	Missense	NM_007194.3	c.962A>C	p.Glu321Ala	0,000008/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_59</b>	<i>NF1</i>	Missense	NM_000267.3	c.1972C>T	p.Leu658Phe	0,000007nr	<b>VUS</b>
<b>ID_60</b>	<i>GALNT12</i>	Missense	NM_024642.4	c.566A>G	p.Asn189Ser	nr/ 0,001708	<b>VUS</b>
	<i>MLH3</i>	Missense	NM_001040108.1	c.2911G>A	p.Val971Ile	0.00025/0.000427	<b>VUS</b>
	<i>NF1</i>	Missense	NM_000267.3	c.3625G>C	p.Val1209Leu	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_61</b>	<i>MUTYH</i>	Missense	NM_001128425.1	c.902C>G	p.Pro301Arg	nr/nr	<b>PP</b>
	<i>MUTYH</i>	Missense	NM_001128425.1	c.536A>G	p.Tyr179Cys	0,00156/0,002135	<b>P</b>
<b>ID_62</b>	<i>NBN</i>	Missense	NM_002485.4	c.1354A>C	p.Thr452Pro	0,00067/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>RET</i>	Missense	NM_020975.4	c.296G>A	p.Arg99Gln	000003/nr	<b>VUS</b>
	<i>LRP6</i>	Missense	NM_002336.2	c.3981_3983delinsGAA	p.Ile1328Asn	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>POLE</i>	Missense	NM_006231.3	c.4903C>T	p.His1635Tyr	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_63</b>	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.94C>T	p.Arg32Cys	0,00003/nr	<b>VUS</b>
	<i>CHEK2</i>	Missense	NM_007194.3	c.962A>C	p.Glu321Ala	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_64</b>	<i>NBN</i>	Missense	NM_002485.4	c.832T>G	p.Ser278Ala	nr/nr	<b>VUS</b>

	<i>SETD6</i>	Missense	NM_001160305.2	c.1018G>A	p.Asp340Asn	0,00168/0,004697	<b>VUS</b>
<b>ID_65</b>	<i>MUTYH</i>	CNV/ deleção	NM_001128425.1	Del E4 -E16 (HM)	-	nr/nr	<b>P</b>
<b>ID_66</b>	<i>MSH6</i>	Missense	NM_000179.2	c.326T>G	p.Leu109Arg	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>BUB1</i>	Missense	NM_004336.4	c.2248C>T	p.Leu750Phe	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.3	c.2289T>A	p.Phe763Leu	0,00070/0,00427	<b>VUS</b>
<b>ID_67</b>	<i>SEMA4A</i>	Missense	NM_022367.3	c.907G>A	p.Val303Ile	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>GALNT12</i>	Missense	NM_024642.4	c.1664C>T	p.Ser555Leu	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>PTEN</i>	Missense	NM_000314.6	c.882T>G	p.Ser294Arg	0,00013/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_68</b>	<i>MSH2</i>	Frameshift	NM_000251.2	c.1613delA	p.Asn538Thrfs*5	nr/nr	<b>P</b>
	<i>PTEN</i>	Missense	NM_000314.6	c.845G>C	p.Gly282Ala	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>LRP6</i>	Missense	NM_002336.2	c.1966A>G	p.Ile656Val	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>POLE</i>	Missense	NM_006231.3	c.861T>A	p.Asp287Glu	nr/0,000427	<b>VUS</b>
<b>ID_69</b>	<i>MSH3</i>	Missense	NM_002439.5	c.1394A>G	p.Tyr465Cys	0,000321/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_71</b>	<i>SEMA4A</i>	Missense	NM_022367.4	c.2131C>T	p.Arg711Trp	0,000014/nr	<b>VUS</b>
	<i>MSH2</i>	Stop gained	NM_000251.3	c.2785C>T	p.Arg929Ter	0,000107/0,000854	<b>VUS</b>
	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.5	c.2911G>A	p.Val971Ile	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_72</b>	<i>MLH1</i>	Stop gained	NM_000249.4	c.1276C>T	p.Gln426Ter	nr/nr	<b>P</b>
	<i>WRN</i>	Missense	NM_000553.6	c.2192A>C	p.Asp731Ala	nr/0,000427	<b>VUS</b>
<b>ID_73</b>	<i>MLH1</i>	Missense	NM_000249.4	c.83C>T	p.Pro28Leu	nr/nr	<b>P</b>
	<i>RET</i>	Missense	NM_020975.6	c.1538C>G	p.Ala513Gly	0,000014/nr	<b>VUS</b>
	<i>BUB1B</i>	Missense	NM_001211.6	c.440T>C	p.Ile147Thr	0,000029/0,002135	<b>VUS</b>
	<i>RNF43</i>	Missense	NM_017763.6	c.1114C>T	p.Pro372Ser	0,000207/nr	<b>VUS</b>

<b>ID_74</b>	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.6	c.1291A>G	p.Met431Val	0,000007/nr	<b>VUS</b>
	<i>FOCAD</i>	Missense	NM_017794.5	c.4781G>A	p.Arg1594Gln	0,000016/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_75</b>	<i>ERCC6</i>	Missense	NM_000124.4	c.4144G>A	p.Gly1382Arg	0,000449/nr	<b>VUS</b>
	<i>ERCC6</i>	Missense	NM_000124.4	c.1801G>A	p.Gly601Ser	0,000200/nr	<b>VUS</b>
	<i>ERCC6</i>	5' UTR	NM_000124.4	c.-11G>C	-	0,000428/0,000109	<b>VUS</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.4	c.7004C>T	p.Thr2335Ile	0,000285/0,000083	<b>VUS</b>
	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.4	c.7174C>T	p.Arg2392Trp	0,000300/0,000427	<b>VUS</b>
	<i>FAN1</i>	Missense	NM_014967.5	c.434G>T	p.Arg145Leu	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>FAN1</i>	Missense	NM_014967.5	c.2201C>T	p.Ala734Val	0,000314/0,000075	<b>VUS</b>
<b>ID_76</b>	<i>CHEK2</i>	Splice region	NM_007194.4	c.320-5T>A	-	0,000699/0,002562	<b>VUS</b>
<b>ID_77</b>	<i>MLH1</i>	Missense	NM_000249.4	c.2038T>C	p.Cys680Arg	nr/nr	<b>P</b>
	<i>SMARCA4</i>	Splice region	NM_001128849.	c.859+5G>A	-	nr/0,000427	<b>VUS</b>
<b>ID_78</b>	<i>FAN1</i>	Frameshift	NM_014967.5	c.34dupA	p.Arg12Lysfs*4	nr/nr	<b>PP</b>
<b>ID_80</b>	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.4	c.6493T>A	p.Ser2165Thr	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_81</b>	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.6	c.1192A>C	p.Lys398Gln	0,000007/nr	<b>VUS</b>
	<i>APC</i>	Missense	NM_000038.6	c.7812C>A	p.Asn2604Lys	nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_82</b>	<i>WRN</i>	Missense	NM_000553.6	c.445C>T	p.Arg149Cys	0,000014/nr	<b>VUS</b>
	<i>GALNT12</i>	Missense	NM_024642.5	c.907G>A	p.Asp303Asn	0,001291/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_83</b>	<i>ATM</i>	Missense	NM_000051.4	c.2735A>G	p.Gln912Arg	0,000029 /nr/nr	<b>VUS</b>
<b>ID_84</b>	<i>WRN</i>	Splice region	NM_000553.6	c.1652+4A>C	-	0,000014/nr	<b>VUS</b>
	<i>NBN</i>	Splice region	NM_002485.5	c.2071-4A>G	-	0,000014 /nr	<b>VUS</b>

ID_85	<i>MSH2</i>	Splice donor	NM_000251.3	c.2211-1G>C	-	nr/nr	<b>PP</b>
	<i>RET</i>	Missense	NM_020975.6	c.1187C>T	p.Ser396Leu	0,000057/nr	<b>VUS</b>
ID_86	<i>NTHL1</i>	splice donor	NM_002528.7	c.115+1G>A	-	0,000021/nr	<b>PP</b>
ID_88	<i>XRCC4</i>	Missense	NM_022406.5	c.976A>C	p.Asn326His	0,000192/nr	<b>VUS</b>
ID_90	<i>MUTYH</i>	Missense	NM_001128425.2	c.1187G>A	p.Gly396Asp	0,003415/nr	<b>P</b>
	<i>MUTYH</i>	Splice	NM_001128425.2	c.933+3A>C	-	0,000128/nr	<b>P</b>
ID_91	<i>FOCAD</i>	CNV/ deleção	NM_001375567.1	E22	-	nr/nr	<b>VUS</b>
	<i>NF1</i>	Missense	NM_000267.3	c.169G>A	p.Gly57Ser	0,000029/nr	<b>VUS</b>
ID_92	<i>BRF1</i>	Missense	NM_001519.4	c.1876G>A	p.Ala626Thr	0,000499/nr	<b>VUS</b>
ID_93	<i>SEMA4A</i>	Missense	NM_022367.4	c.494C>T	p.Ser165Leu	0,000071/nr	<b>VUS</b>
	<i>BRIP1</i>	Missense	NM_032043.3	c.3693A>G	p.Ile1231Met	0,000007/nr	<b>VUS</b>

Fonte: Autoria própria.

NR - não relatado; P – patogênica; PP – provavelmente patogênica; VUS – variante de significado incerto.

Interessantemente, dentre os pacientes negativos ou portadores de VUS, em 11 pacientes esperávamos encontrar variantes P/PP, pois possuíam dMMR (7 casos) e/ou se enquadravam nos critérios de Amsterdam I/II (4 casos) (**Tabela 10**). Dentre esses casos, 5 apresentavam perda de expressão de MLH1/PMS2, e para 4 deles foi possível realizar a análise de metilação em *MLH1* e/ou mutação de *BRAF*, e todos foram negativos para os marcadores avaliados. Para um caso (ID\_37) foi realizado painel tumoral ampliado de 409 genes e foi detectada mutação somática de perda de função em *MLH1* (c.991G>T; p.Glu331Ter - frequência da variante: 59%).

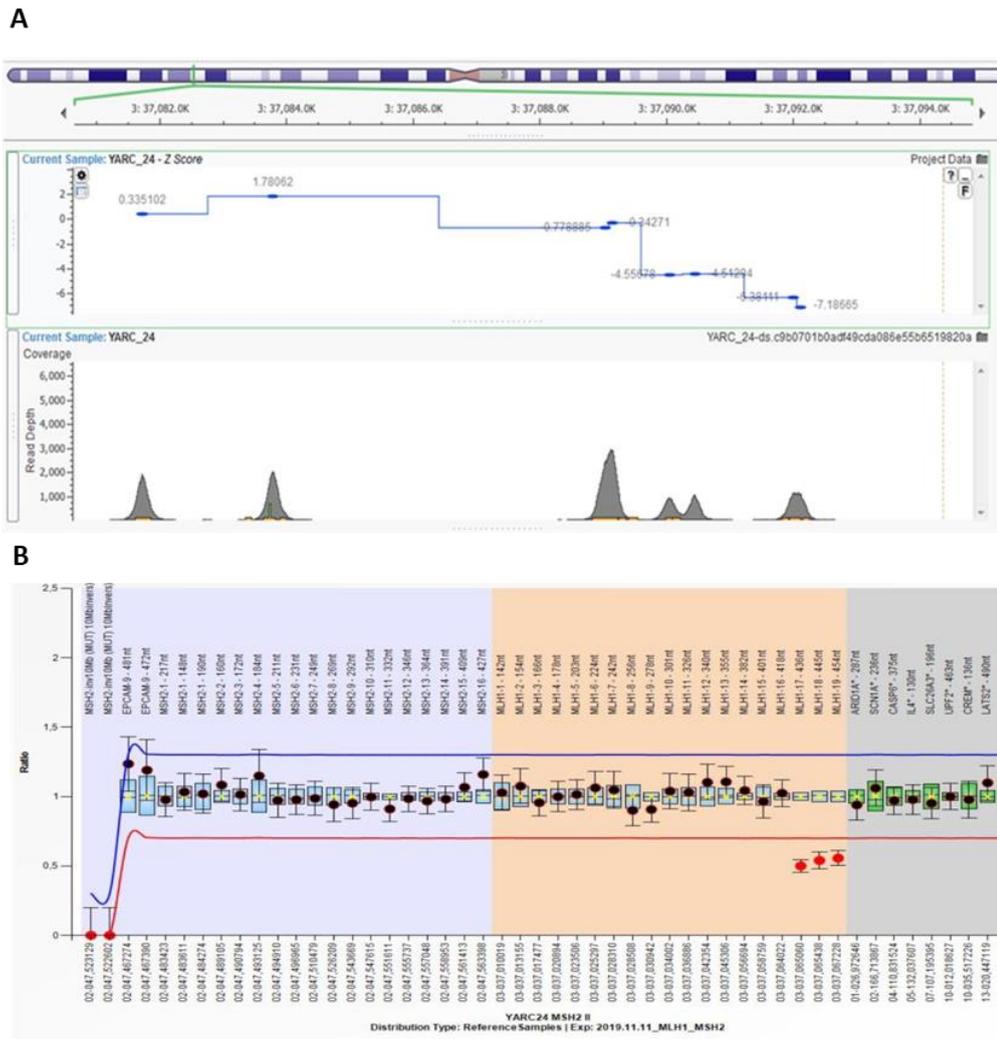
**Tabela 10** - Descrição de dados clínicos de 11 pacientes *Lynch-Like* e Amsterdam sem variantes P/PP.

ID	Idade CCR	Sexo	Status MMR	Status RAS/BRAF	Metilação <i>MLH1</i>	História familiar	Gene	Classificação ACMG
ID_25	35	F	Perda <i>MLH1</i> / <i>PMS2</i>	<i>BRAF</i> Selvagem	Não metilado	1 Parente de 2º grau com CCR		Negativo
ID_35	32	M	Perda <i>MSH2</i> / <i>MSH6</i>	<i>KRAS</i> c.35G>A (Gly12Asp) (G12D)	Nr	Sem história Familiar de CCR		Negativo
ID_37	28	M	Perda <i>MLH1</i> / <i>PMS2</i>	<i>BRAF</i> Selvagem	Não metilado	Sem história Familiar de CCR	<i>APC</i>	VUS
ID_41	44	M	Perda <i>MLH1</i> / <i>PMS2</i>	<i>KRAS</i> c.38G>A (Gly13Asp) (G13D)	Nr	Sem história Familiar de CCR		Negativo
ID_44	38	F	Perda <i>MSH2</i> / <i>MSH6</i>	<i>KRAS</i> c.38G>A (Gly13Asp) (G13D) <i>BRAF</i> Selvagem	Nr	Sem história Familiar de CCR	<i>ERCC6</i> <i>CDKN1B</i> <i>BRIP1</i>	VUS VUS VUS
ID_45	48	M	Perda <i>MLH1</i> / <i>PMS2</i>	Nr	Nr	1 Parente de 1º grau com CCR		Negativo
ID_47	36	F	Perda <i>MLH1</i> / <i>PMS2</i>	<i>BRAF</i> Selvagem	Não metilado	1 Parente de 2º grau com CCR		Negativo
ID_04	35	F	Nr	Nr	Nr	Amsterdam	<i>MUTYH</i> <i>MSH2</i>	VUS VUS
ID_26	48	M	pMMR	Nr	Nr	Amsterdam	<i>BRF1</i>	VUS
ID_27	34	M	pMMR	<i>KRAS</i> c.35G>A (Gly12Asp) (G12D)	Nr	Amsterdam	<i>MSH3</i>	VUS
ID_74	43	F	Nr	Nr	Nr	Amsterdam	<i>APC</i> <i>FOCAD</i>	VUS VUS

Fonte: Autoria própria.

CCR – câncer colorretal; pMMR – proteínas MMR proficientes; Nr – Não realizado; F – Feminino; M – Masculino; VUS – variante de significado incerto.

Quatro dos 89 pacientes apresentaram alguma variante de alteração no número de cópias (CNVs). Dois pacientes (ID\_24, ID\_38) apresentaram uma grande deleção no gene *MLH1*, envolvendo os éxons 17, 18 e 19, a qual foi detectada por análise de NGS e confirmada através do método de MLPA (**Figura 11**), 1 paciente (ID\_64) apresentou uma deleção em *MUTYH* dos éxons 4-16 em homocigose, 1 paciente (ID\_91) apresentou uma deleção em *FOCAD* (não validada, considerada VUS).



Fonte: Autoria própria.

**Figura 11** – Deleção dos éxons 17-19 *MLH1* no paciente ID\_24. **(A)**: Análise por NGS evidenciando o valor de Z score <-3, em três regiões exônicas (éxons 17, 18 e 19) do gene *MLH1*, caracterizando a presença de deleção em heterocigose. **(B)**: Análise confirmatória por MLPA, evidenciando razões próximas de 0,5 para as sondas dos éxons 17, 18 e 19 do gene *MLH1*, confirmando a presença da deleção.

## 8.5 Comparações dados clínicos de pacientes com e sem alterações germinativas

Foram avaliados os dados clínicos dos 89 pacientes sequenciados através da análise do painel multi-genes, comparando os 24 pacientes nos quais foram detectadas variantes P/PP com os 65 pacientes negativos ou com VUS (WT/VUS) (**Tabela 11**).

**Tabela 11** - Características clínicas dos 89 pacientes que passaram por análise de painel multigênico com 62 genes de predisposição ao câncer.

Coorte com 89 pacientes analisados				
Características	WT/VUS	P/PP	Total	Valor-P
	N (%)	N (%)	N (%)	
<b>Sexo</b>				
F	37 (56,9%)	10 (41,7%)	47 (52,8)	0,3
M	28 (43,1%)	14 (58,3%)	42 (47,2%)	
Total	65	24	89	
<b>IHQ para MMR</b>				
pMMR	47 (87,0%)	8 (40,0%)	55 (74,3%)	<b>0,0001</b>
dMMR	<b>7 (13,0%)</b>	<b>12 (60,0%)</b>	19 (25,7%)	
Total	54	20	74	
<b>História familiar para CCR</b>				
Sem histórico familiar	19 (29,2%)	7 (29,2%)	26 (29,2%)	0,19
>1 parente de 1° grau com CCR	13 (20,0%)	4 (16,7%)	17 (19,1%)	
>1 parente em 2° grau com CCR	28 (43,1%)	7 (29,2%)	35 (39,3%)	
Amsterdam	5 (7,7%)	6 (25,0%)	11 (12,4%)	
Total	65	24	89	
<b>Teste tumoral - KRAS/NRAS/BRAF</b>				
KRAS/NRAS/BRAF selvagem	11 (27,5%)	5 (31,3%)	16 (28,6%)	0,69
KRAS/NRAS selvagem	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	
KRAS selvagem	4 (10,0%)	4 (25,0%)	8 (14,3%)	
KRAS mutado	20 (50,0%)	7 (43,8%)	27 (48,2%)	
NRAS mutado	3 (7,5%)	0 (0,0%)	3 (5,4%)	
BRAF mutado	1 (2,5%)	0 (0,0%)	1 (1,8%)	
Total	40	16	56	
<b>Outros primários</b>				
Não	57 (87,7%)	13 (54,2%)	70 (78,7%)	<b>0,002</b>
Sim	<b>8 (12,3%)</b>	<b>11 (45,8%)</b>	19 (21,3%)	

Total	65	24	89	
<b>Lateralidade do tumor</b>				
Colón direito	15 (23,1%)	5 (20,8%)	20 (22,5%)	0,388
Colón esquerdo	50 (76,9%)	18 (75,0%)	68 (76,4%)	
Outros	0 (0,0%)	1 (4,2%)	1 (1,1%)	
Total	65	24	89	

**Fonte:** Autoria própria.

WT – Selvagem (negativo para os 62 genes avaliados); VUS – variante de significado clínico incerto; P – variante patogênica; PP – variante provavelmente patogênica; F – sexo feminino; M - sexo masculino; dMMR – proteínas MMR deficientes; pMMR – proteínas MMR proficientes; CCR – câncer colorretal.

A maioria das características clínicas comparadas não tiveram diferença estatística entre os grupos, com exceção dos subgrupos relacionados a IHQ para as proteínas MMR e a presença de outros tumores primários. Quando levamos em consideração as características de critérios de seleção, a presença de dMMR foi mais frequente no grupo de pacientes que possuíam variantes P/PP, ocorrendo em 60% desse grupo, em contraste com apenas 13% dos pacientes que apresentaram VUS ou foram negativos para alterações ( $P < 0,0001$ ). Ainda, dentre os 19 pacientes com dMMR, 12 (63,2%) apresentaram variantes P/PP, todos em genes compatíveis com a perda observada por IHQ.

E por fim, a presença de outros tumores primários foi mais frequente em paciente com variantes P/PP ( $P = 0,002$ ), ocorrendo em 45,8% desses pacientes, em comparação com apenas 12,3% dos pacientes WT/VUS. Dentre os 11 pacientes com outros tumores primários e variantes P/PP, 8 eram portadores de variantes em genes da SL, 1 de variantes em *MUTYH* (monoalélico) e *XRCC4* concomitantes, 1 *MUTYH* bialélico e 1 em *NTHL1* (monoalélico). Um segundo CCR foi o tumor mais comum nesses pacientes (7 casos), seguido por carcinoma papilífero de tireoide (2 casos), e um caso cada de carcinoma de células renais, tumor de pelve renal, carcinoma basocelular, carcinoma epidermoide e glioblastoma.

## 9. DISCUSSÃO

### 9.1 Validação do teste NGS baseado em *amplicon* para avaliar a metilação do promotor *MLH1* e sua correlação com a mutação *BRAF-V600E* em pacientes com câncer colorretal.

Neste objetivo do estudo, desenvolvemos e validamos um teste simples, barato e quantitativo baseado em NGS para avaliar a metilação do promotor *MLH1*. Mostramos que o teste teve uma alta especificidade, com a detecção de metilação de *MLH1* acima do ponto de corte de 10% sendo observada apenas em tumores deficientes em *MLH1/PMS2* e em nenhum dos tumores deficientes em *MSH2/MSH6* ou amostras de saliva. Além disso, demonstramos uma alta concordância (90%) do estado de metilação de *MLH1* para a mutação somática *BRAF V600E* em amostras de CCR de pacientes brasileiros.

A concordância entre esses dois marcadores em tumores CCR tem sido amplamente investigada em outros estudos e foram descritas diferenças entre sua co-ocorrência para algumas populações. Dados de países ocidentais mostraram taxas de concordância de 81-83%<sup>73, 74</sup>. Por outro lado, estudos em pacientes chineses com CCR observaram uma frequência geral menor de mutações *BRAF*, com apenas 15% - 17% dos pacientes com perda de *MLH1* apresentando mutação *BRAF V600E* e 45% dos pacientes *BRAF* negativos sendo positivos para metilação de *MLH1*, levando a uma concordância de cerca de 60% entre os dois marcadores<sup>75, 76</sup>.

Esses dados mostram que a metilação do promotor *MLH1* pode melhorar significativamente a identificação da causa subjacente de tumores esporádicos deficientes em *MLH1*. Essa identificação é importante, pois pode auxiliar no aconselhamento genético e evitar outros testes moleculares desnecessários, como o sequenciamento somático de genes MMR. Nesse sentido, as diretrizes da NCCN para Avaliação Genética/Familiar de Alto Risco: Colorretal (Versão: 1.2022) recomendam que os casos com expressão anormal de MMR, negativos para mutações em *BRAF* e para variantes patogênicas germinativas sejam avaliados para metilação de *MLH1*, para confirmar ou refutar um CCR esporádico.

Além disso, o teste de metilação de *MLH1* também é importante no contexto de

carcinoma de endométrio (CE), uma vez que neste tipo de tumor nenhum outro biomarcador somático pode indicar metilação de *MLH1* e, portanto, classificar um tumor deficiente em MMR como esporádico <sup>77. 78.</sup> De fato, no CE, a frequência de tumores deficientes em *MLH1/PMS2* é de cerca de 20%, e mais de 85% desses tumores são positivos para metilação de *MLH1* <sup>80.</sup>

Um achado interessante do nosso estudo foi a identificação de um paciente com Síndrome de Lynch com metilação somática do promotor *MLH1*. Este paciente era portador de uma grande deleção germinativa em *MLH1* (exons 17-19), tinha uma porcentagem de metilação de *MLH1* de 11% e ausência de mutações em *BRAF*. Outros estudos também descreveram tumores metilados *MLH1* em pacientes com SL <sup>81. 76. 81,</sup> sendo que um dos maiores estudos descreve que até 5,6% dos tumores CCRs em pacientes com SL apresentam metilação em *MLH1* <sup>74.</sup> Por outro lado, a mutação *BRAF* tem sido mais raramente descrita em pacientes com SL, o que sugere que o status de *BRAF* no tumor é mais sensível do que o status de metilação do promotor *MLH1* como um preditor negativo de mutação germinativa dos genes MMR.

Em nosso experimento de diluição seriada, observamos que todas as diluições abaixo de 100% de DNA metilado apresentaram uma razão de metilação acima do esperado e que níveis intermediários de metilação apresentaram maior variação entre as triplicatas. Isso possivelmente pode ser explicado por diferenças na estabilidade ou nas taxas de amplificação entre as fitas de DNA metiladas e não metiladas. Notavelmente, esses resultados são semelhantes aos descritos por Benhamida <sup>83</sup> em seu estudo avaliando a metilação do promotor *MLH1* usando uma plataforma de *Genome-Wide Methylation Array*. Embora esses resultados impeçam que nosso teste seja um ensaio quantitativo, o ponto de corte estabelecido em 10% para uma classificação dicotômica (metilado x não metilado) apresentou excelente desempenho.

A definição do status de expressão das proteínas MMR nos casos de CCR e CE faz parte da rotina de diagnóstico clínico na maioria dos hospitais especializados em câncer. No CCR, a identificação de um paciente com um tumor deficiente em *MLH1* deve ser seguida por análise de mutação *BRAF* ou análise de metilação do promotor *MLH1* e, para CE, apenas análise de metilação *MLH1*, para identificar pacientes com maior probabilidade de ter causas

somáticas levando a deficiência de MLH1. Para pacientes negativos, o acompanhamento com um geneticista e testes genéticos são recomendados e provavelmente testes genéticos germinativos.

Apesar de sua relevância definida, a investigação da metilação do promotor *MLH1* não está amplamente disponível nos laboratórios de diagnóstico molecular no Brasil e seu uso na rotina clínica ainda é pouco utilizado. Como a maioria dos laboratórios moleculares hoje possui plataformas de sequenciamento NGS, um teste baseado em NGS para avaliar a metilação do promotor *MLH1* pode ser facilmente implementado na maioria dos laboratórios clínicos que realizam testes moleculares para oncologia.

## **9.2 Sequenciamento de painel multi-gênico customizado com 62 genes de predisposição ao câncer.**

Neste estudo também realizamos o sequenciamento de um painel multi-gênico customizado com 62 genes de evidências definitiva/forte, moderada, limitada ou não avaliada para predisposição hereditária ao CCR (conforme classificados no trabalho de Seifert <sup>21</sup>, incluindo genes recentemente descritos em estudos de sequenciamento de exoma de pacientes com CCR (revisado por Valle <sup>20</sup>. Selecionamos pacientes com critérios sugestivos de apresentarem causas hereditárias para o desenvolvimento do CCR, como idade precoce, histórico familiar de CCR e marcadores somáticos específicos. Através da análise do painel multi-genes em 89 pacientes, vimos que 27% (24/89) apresentaram variantes P/PP. Como esperado, a maioria das alterações germinativas P/PP identificadas (66,7%), foram nos genes relacionados a síndrome de Lynch (*MLH1*, *MSH2* e *MSH6*). Além das alterações em genes correlacionados a Lynch, também identificamos variantes P/PP nos genes *MUTYH*, *NTHL1*, *RAD51C*, *FAN1* e *XRCC4*.

Dados de literatura indicam que 6 a 10% de todos CCRs surgem devido a síndromes hereditárias, sendo a síndrome de Lynch a mais comum e responsável por cerca de 3% delas <sup>83, 84</sup>. As mutações em *MLH1* e *MSH2* são em geral as mais frequentes, enquanto mutações em *MSH6* e *PMS2* estão presentes em menor frequência, o que também foi observado em

nossos resultados<sup>85. 86. 87</sup>. Dos 16 pacientes que apresentaram variantes P/PP nos genes de Lynch, 12 deles possuíam HF para CCR (incluindo casos com apenas parentes de 1° e 2° grau e com critérios de Amsterdam) e 4 não possuíam HF para CCR.

Em nossa coorte, somente um paciente com variante P/PP nos genes de Lynch apresentou tumor com expressão preservada das proteínas MMR (caso ID\_85 com variante PP em sítio de *splice* no gene *MSH2*). Em um trabalho anterior do nosso grupo, 28% (6/21) dos pacientes confirmados como portadores de SL apresentam resultados conflitantes entre IHQ e a variante germinativa patogênica identificada<sup>87</sup>. Em quatro pacientes, os tumores mostraram perda isolada de PMS2, e as variantes encontradas eram em *MLH1*. Os outros dois casos revelaram expressão normal das quatro proteínas, sendo que um deles apresentou uma amplificação de um éxon de *MSH2* e o outro um códon de parada prematuro no último éxon codificante do gene *MLH1*. Em outro estudo, Hechtman e colaboradores<sup>89</sup> avaliaram 36 casos com análise discordante de IHQ para MMR e instabilidade de microssatélites (MSI), e identificaram que nos casos discordantes havia um enriquecimento de variantes *missense* germinativas ou somáticas nos genes MMR em relação a variantes de perda de função comparados aos casos concordantes (p=0.0007). Ainda, dos 5 pacientes com alterações patogênicas germinativas em *MSH2* e tumor pMMR desse estudo, 1 apresentou uma variante de *splice* (*MSH2*: c.942A+3>T). Estes casos refletem que apesar das alterações na imunoexpressão das proteínas MMR serem um importante marcador fenotípico para a suspeita de SL, existem limitações inerentes a esta técnica, como casos falso-positivos nos quais os anticorpos podem estar detectando o fragmento residual de uma proteína não funcional, ou a marcação com o anticorpo pode ser heterogênea ao longo do tumor e afetar a interpretação e sensibilidade do teste<sup>90. 91. 92</sup>.

Em nossos casos, dos 19 pacientes dMMR avaliados com o painel, 7 pacientes (36,8%) não apresentaram variantes P/PP germinativas nos genes MMR. Destes, 5 eram dMMR para *MLH1*/PMS2 e 2 eram dMMR para *MSH2*/*MSH6*. Foi possível avaliarmos metilação de *MLH1* e/ou mutação em *BRAF* para 4 dos casos com perda *MLH1*/PMS2, sendo que todos foram negativos para um ou ambos os marcadores. Casos como estes são conhecidos como portadores da síndrome de Lynch-like (SLL), termo proposto para identificar pacientes com dMMR, sem hipermetilação do promotor *MLH1* e que não

apresentam nenhuma variante germinativa nos genes MMR<sup>93</sup>. Para um dos nossos casos de SLL, a realização de um painel somático amplo no tumor identificou uma mutação somática de perda de função em *MLH1*.

Estudos prévios identificaram que de 2,5% a 3,9% dos casos de CCRs apresentam dMMR sem apresentarem metilação em *MLH1* ou variantes germinativas P/PP nos genes MMR<sup>94</sup>. Causas potenciais tem sido sugerida para explicar a SLL, podendo elas serem causas germinativas ou somáticas<sup>95. 95</sup>. Do ponto de vista germinativo, indivíduos classificados como SLL podem na realidade serem indivíduos com SL portadores de alterações complexas nos genes MMR não detectadas nos testes genéticos convencionais, como variantes em regiões não codificantes e inversões gênicas, ou ainda apresentarem alterações germinativas em outros genes de reparo de DNA, como *POLE*, *MUTYH*, e outros, que podem levar a alterações somáticas nos genes MMR<sup>96. 97. 98</sup>. Do ponto de vista somático, alterações somáticas nos dois alelos de algum dos genes MMR foram demonstradas como sendo a causa mais comum de SLL. Nesse sentido, Carwana e colaboradores<sup>94</sup> realizaram o sequenciamento germinativo e tumoral pareado em 50 pacientes SLL, e identificaram que 62% dos casos tinham causas esporádicas (mutações somáticas em MMR), 6% eram portadores de SL (variantes que não foram identificadas no primeiro teste) e 32% dos casos não puderam ser elucidados. Portanto, a SLL é na realidade um grupo heterogêneo de pacientes, e composto por casos hereditários e esporádicos. Diferenciar esses casos é um desafio atual no manejo das condições de alto risco<sup>100</sup>.

Variantes patogênicas em *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* foram bastante representativas em nossas coorte, estando presentes como variantes pontuais do tipo *missense*, *stop gained*, *frameshift*, *splice site* e também CNVs. Curiosamente dois pacientes possuíam uma grande deleção que compromete os éxons 17 a 19 do gene *MLH1*. O ID\_24 (sexo feminino, 47 anos de idade, apresentava dMMR para *MLH1/PMS2*, com promotor *MLH1* metilado, *KRAS/NRAS* e *BRAF* selvagens, HF para CCR característico de Amsterdam; e o ID\_38, sexo masculino, 46 anos de idade, apresentava dMMR para *MLH1/PMS2*, HF característico para Amsterdam). A presença de grandes deleções em *MLH1* e *MSH2* em pacientes suspeitos para SL apresenta uma frequência de cerca de 10% e em pacientes que se enquadram nos critérios de Amsterdam essa porcentagem pode chegar a 12%<sup>100. 101. 102. 103</sup>. Assim, é impertivo que os

testes genéticos para esses indivíduos contemplem a análise de CNVs, seja através de *pipelines* para NGS validados para esse fim ou por outras técnicas, como MLPA.

Cinco pacientes apresentaram mutações germinativas P/PP no gene *MUTYH*. Três destes pacientes (3/89 - 3,3%) (ID\_61, ID\_64 e ID\_90) possuíam alterações bialélicas P/PP em *MUTYH* (3/5 – 60%), todos com pMMR e mutação somática em *KRAS* c.34G>T (G12C), dois sem histórico familiar para CCR e um com HF compatível com Amsterdam. Dos 3 pacientes bialélicos, somente 1 apresentava polipose atenuada (16 pólipos). Dois pacientes (ID\_05, ID\_06) tinham mutações monoalélicas e HF em primeiro grau para CCR, o paciente ID\_06 também apresentou uma variante patogênica no gene *XRCC4*, pMMR e mutação em *KRAS* c.38G>A (Gly13Asp). O ID\_05 apresentou dMMR para *MLH1/PMS2* por metilação no promotor *MLH1* e *RAS/BRAF* WT.

Alterações bialélicas patogênicas em *MUTYH* estão relacionadas a uma doença autossômica recessiva conhecida como Polipose associada a *MUTYH* (MAP) <sup>105</sup>. E por ser uma doença recessiva e com expressividade muito variável, muitos pacientes com MAP não têm histórico familiar de CCR ou pólipos, e a doença pode aparecer como um caso esporádico <sup>106</sup>. Tumores e pólipos associados à MAP geralmente são proficientes em MMR, no entanto, MSI também pode ser detectado devido à inativação somática dos genes MMR, explicando assim alguns casos de SLL <sup>106, 96</sup>. Um dos critérios que utilizamos para selecionar indivíduos para o teste germinativo foi a presença da mutação somática *KRAS*-G12C. A proteína *MUTYH* é uma DNA glicosilase que faz parte do sistema de reparo por excisão de base (BER), e atua reparando danos oxidativos do DNA. Tumores com deficiências na via BER apresentam um excesso de transversões G:C→T:A, sendo que nos tumores colorretais essas mutações podem ser detectadas particularmente nos genes *APC* e *KRAS*. O gene *KRAS* é frequentemente analisado somaticamente em CCR metastático para prever a resposta de antagonistas de *EGFR*. A mutação *KRAS* c.34G>T (G12C) é um marcador sugestivo de polipose associada a *MUTYH*, uma vez que é uma mutação somática rara em CCR esporádico (<3%) e está presente em mais de 80% dos CCRs de pacientes MAP <sup>71, 107</sup>. Embora grupos anteriores tenham sugerido o uso do *KRAS*-G12C como marcador para identificação de pacientes com MAP <sup>71, 109</sup>, não ocorreu uma ampla adoção desse biomarcador. Por exemplo, nenhuma das diretrizes atuais da European Society for Medical Oncology (ESMO), da

American Society of Clinical Oncology (ASCO) e da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) para triagem de pacientes em risco para câncer colorretal hereditário recomenda testar o gene *MUTYH* em pacientes com essa mutação somática. No nosso estudo, dos 11 indivíduos com mutação *KRAS-G12C* avaliados no painel germinativo, 3 (27,3%) apresentaram alterações bialélicas em *MUTYH*, corroborando o importante papel desse biomarcador para identificar pacientes com polipose associada ao *MUTYH*.

Em relação aos portadores monoalélicos de *MUTYH*, estudos indicam que esses indivíduos apresentam um risco ligeiramente aumentado de CCR (1,5-2,5 vezes em relação à população geral), particularmente na presença de história familiar de CCR, embora as evidências ainda sejam conflitantes <sup>110</sup>. Dessa forma, os heterozigotos monoalélicos para *MUTYH*, que não desenvolvem polipose, se beneficiariam de medidas de triagem populacional, mas também poderiam receber triagem colorretal de risco moderado médio com base em seu histórico familiar <sup>110</sup>. Ainda, portadores monoalélicos também podem apresentar um risco aumentado para o desenvolvimento de neoplasias extracolônicas, chegando a um aumento de até 9X para câncer gástrico <sup>110</sup>.

Interessantemente o paciente ID\_06 apresentou além da variante patogênica em *MUTYH*, também apresentou uma variante no gene *XRCC4*. O gene *XRCC4* (*X-ray repair cross complementing 4*) codifica uma proteína que funciona em conjunto com a DNA ligase 4 e a proteína quinase dependente de DNA no reparo de quebras de fita dupla do DNA. Esta proteína desempenha um papel tanto na junção de extremidades não homólogas quanto na conclusão da recombinação V(D)J (recombinação somática) <sup>111</sup>. Foi observado que polimorfismos neste gene levam a um risco aumentado de desenvolvimento de CCR <sup>111.112.113</sup>. Esteban-Jurado e colaboradores (2015), através de um estudo de exoma com famílias com fenótipo de CCR hereditário identificou uma alteração de perda de função em *XRCC4* em uma família, considerando esse gene um candidato para predisposição ao CCR <sup>114</sup>. Outros dados de sequenciamento de casos e controles não mostram uma super-representação de variantes previstas como patogênicas em pacientes com CCR familiar/de início precoce (8/1006) em comparação com controles (11/1609) <sup>115</sup>.

Também identificamos 1 paciente (ID\_86), sexo feminino, 40 anos de idade, com histórico familiar em segundo grau de CCR (tio paterno com CCR aos 60 anos de idade), sem

perda de expressão das proteínas MMR, a qual a apresentou uma variante PP heterozigota no gene *NTHL1* (c.115+1G>A). O gene *NTHL1* está envolvido no reparo do DNA, também participando da via BER, e recentemente foi reconhecido como um gene associado a predisposição hereditária ao câncer, onde a presença de variantes germinativas P/PP bialélicas estão associadas a uma rara síndrome tumoral (polipose associada ao *NTHL1*), uma condição hereditária autossômica recessiva caracterizada por um risco aumentado de desenvolver CCR ao longo da vida <sup>116. 117. 118. 119</sup>.

Além disso, alterações bialélicas em *NTHL1* sugerem uma predisposição para um fenótipo multitumoral, não se limitando a polipose e CCR como também em (pré) malignidades cervicais e carcinomas basocelulares, cânceres de células uroteliais, carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, malignidades hematológicas, (pré) malignidades endometriais e tumores cerebrais, além de ter sido descrito um risco baixo a moderado para câncer de mama. Deficiência nas funções de *NTHL1* resulta no acúmulo de alterações somáticas, aumentando o risco de desenvolvimento de câncer <sup>119. 120</sup>. Dados sobre como as alterações monoalélicas em *NTHL1* podem influenciar o risco de câncer são bem escassos. Trabalhos recentes demonstram que alterações monoalélicas em *NTHL1* não contribuem substancialmente para o desenvolvimento de câncer colorretal <sup>121. 122</sup>.

A identificação de pacientes em risco de suscetibilidade hereditária ao câncer depende da capacidade de caracterizar genes e alterações associadas ao aumento do risco de câncer e estabelecer indicações apropriadas para testes genéticos. Vários estudos foram realizados a fim de incluir e reinterpretar os espectros fenotípicos de síndromes hereditárias de predisposição ao câncer bem caracterizadas, definindo genes de alto e moderado risco <sup>123. 124. 125</sup>. Foi pensando nisso que desenvolvemos o desenho de um painel que inclui, além de genes de evidência alta de associação ao CCR, genes de evidência moderada e limitada, que geralmente não estão nos painéis usados na clínica, tendo como objetivo avaliar sua possível contribuição na população brasileira. Destacamos aqui que identificamos alterações em genes de evidência limitada para risco de câncer colorretal, como os genes *FAN1* e *ERCC4*, nos quais 3 pacientes da nossa coorte apresentaram variantes P/PP. Ainda, identificamos 1 paciente com variante P/PP em *RAD51C*, um gene sem definição de associação com CCR e que não foi avaliado pelo estudo de Seifert <sup>21</sup>.

Identificamos dois pacientes apresentaram variantes PP no gene *FAN1*. O ID\_24, paciente do sexo feminino, 47 anos de idade, com perda de expressão de *MLH1/PMS2*, com promotor *MLH1* metilado, *KRAS/NRAS/BRAF* selvagens e com histórico familiar para CCR, além de apresentar 1 mutação PP em *FAN1*, também possuía alteração germinativa patogênica em *MLH1*. O paciente ID\_78, sexo masculino, 44 anos de idade, MMR proficientes, *KRAS/NRAS/BRAF* selvagens e com histórico familiar em segundo grau para CCR, apresentou alteração P/PP apenas em *FAN1*.

O gene *FAN1* (*FANCD2/FANCI-Associated Nuclease 1*) é responsável por codificar uma nuclease envolvida no reparo cross-link entre as fitas do DNA, foi identificado como um potencial gene de predisposição para pólipos colorretais CCR. Aproximadamente 3% (5/176) das famílias que preenchem os critérios de Amsterdam e que tem cânceres com MMR proficientes sem mutações previamente associadas possuem alterações germinativas em *FAN1* <sup>128</sup>. Em uma análise estruturada baseada em evidências e em um estudo caso-controle com 863 pacientes com CCR e 1604 indivíduos controle, Broderick et al <sup>129</sup> considerou que a contribuição de *FAN1* em CCR hereditário foi duvidosa, tanto devido a evidência de co-segregação fraca das cinco famílias relatadas por Segui <sup>128</sup> ( $p=0,125$ ) quanto pela ausência de enriquecimento de alterações patogênicas no grupo de casos ( $p=0,19$ ) <sup>129</sup>. Outro estudo recente avaliou a presença de variantes deletórias de *FAN1* (*stop-gain* e *frameshift*) em pacientes com suspeita clínica de predisposição para CCR/polipose ( $n=436$ ), câncer de mama e/ou ovário ( $n=3.991$ ) e outros cânceres/condições ( $n=709$ ), encontrando frequências alélicas de 0,46%, 0,35% e 0,28%, respectivamente, não havendo diferença entre as frequências de nenhum dos grupos e da população em geral (bancos 1000 Genomes e gnomAD) <sup>130</sup>.

O paciente (ID\_56) do sexo masculino, 28 anos de idade com adenocarcinoma de colón direito, sem histórico familiar para CCR (apenas uma tia paterna com câncer de mama aos 54 anos de idade), sem perda de expressão das proteínas *MMR*, que apresentou uma variante P no gene *RAD51C*. Mutações no gene *RAD51C* estão associadas a um risco aumentado para síndrome hereditária de câncer de mama (CM) e ovário (CO), sendo a predisposição hereditária observada para CO de cerca de 10% <sup>129, 130</sup>.

O gene *RAD51C* está envolvido na via de recombinação homóloga, reparo de

quebras de DNA de fita dupla e na manutenção da estabilidade genômica <sup>131. 132.</sup> Mutações *nonsense*, *frameshift*, sítio de *splice*, e *missense* são observadas com *RAD51C*; no entanto, há evidências limitadas da associação desses tipos de mutação com câncer de mama familiar <sup>133. 134.</sup> A relação entre variantes em *RAD51C* e o risco para CM para homens foi inicialmente excluída, devido sua correlação com CO, porém estudos mais recentes com uma grande coorte de pacientes com câncer de mama masculino identificou variantes fundadoras P nos genes *RAD51C* e *RAD51D* em 0,14% de pacientes finlandeses, inferindo uma associação de variantes em *RAD51C* e o risco para CM em homens <sup>135. 136 137.</sup> Porém, em relação à presença de alterações em *RAD51C* e a predisposição ao CCR, dados mostram que não há um aumento de risco para esse tumor <sup>137. 138. 136.</sup>

A predisposição genética ao CCR pode ser causada por variantes patogênicas germinativas em genes de alta penetrância. Porém uma proporção relevante de pacientes com câncer colorretal diagnosticados em idade jovem e/ou com história familiar desse tipo de câncer não carregam alterações germinativas em genes de câncer hereditários conhecidos <sup>139. 115.</sup> Dados demonstram que para esse grupo de pacientes com CCR sem variantes patogênicas em genes de alto risco a explicação mais plausível é o acúmulo de alelos de baixo risco (*low risk alleles*), especialmente na presença de história familiar de CCR <sup>141.</sup>

Em nossa coorte, identificamos 5 pacientes (ID\_04; ID\_26; ID\_27; ID\_67 e ID\_74) que se enquadravam nos critérios de Amsterdam e não apresentaram variantes P/PP, possuíam uma idade média de 39 anos e eram MMR proficientes ou sem informação para esse marcador. E apesar dos critérios clínicos de Amsterdam serem aplicados historicamente para identificar aqueles em risco de LS, sua sensibilidade é de apenas 78% na população adulta e possivelmente menor em adolescentes e jovens adultos <sup>142.</sup> O câncer colorretal familiar tipo X (FCCTX) poderia ser usado para definir esses 5 casos, pois são indivíduos com CCR cujas famílias atendem aos Critérios Amsterdam, mas cujos tumores são proficientes para MMR <sup>141. 142.</sup>

Além dos alelos de baixo risco, outros fatores podem implicar no desenvolvimento de câncer colorretal e foi demonstrado que os indivíduos estão em risco aumentado para CCR se eles (ou seus parentes) tiveram câncer, história de pólipos de cólon, doenças

inflamatórias intestinais, diabetes mellitus ou colecistectomia. Além disso, fatores de estilo de vida também desempenham papéis importantes na etiologia do CCR, bem como sobrepeso e obesidade, inatividade física, tabagismo, consumo de álcool e padrões alimentares inadequados (dieta pobre em fibras, frutas, vegetais, cálcio e produtos dietéticos e rico em carne vermelha e processada) aumentam o risco de CCR. O microbioma intestinal, idade, sexo e raça e status socioeconômico também são conhecidos por influenciar o risco de câncer colorretal <sup>143, 144</sup>.

Por fim, uma parte da hereditariedade incompreendida (*“missing heritability”*) do CCR pode ser causada por variantes monogênicas de alto risco ainda não descritas <sup>147</sup>. Nos últimos anos, estudos de exoma germinativo baseados em coortes ou famílias afetadas <sup>20, 148</sup>, e mais recentemente, estudos baseados em sequenciamento de exoma pareado germinativo e tumoral, Quintana et al <sup>149</sup> identificaram novos genes que podem estar associados à síndrome do câncer colorretal familiar tipo X (FCCTX) ou aumento de risco de CCR. Alguns desses genes recentemente identificados como candidatos estavam incluídos em nosso painel, porém uma vez que não foram encontradas alterações P/PP na maioria deles, nossos dados indicam que caso sejam relevantes para risco de CCR, devem ocorrer em um número pequeno de pacientes e coortes maiores devem ser avaliadas em estudos caso-controle apropriados para confirmar/refutar sua associação ao CCR hereditário.

Em nosso estudo, buscamos utilizar alguns critérios para selecionar dentro do grupo de pacientes com CCR aqueles com maior risco de apresentarem alterações germinativas patogênicas. Ao longo das últimas 4 décadas, houve uma evolução dos critérios clínicos utilizados para selecionar pacientes com CCR para os testes genéticos, uma vez que com um menor custo e maior acesso aos testes, foram sendo recomendados critérios menos restritivos, aumentando a possibilidade de detectar mais pacientes com SPHC, porém diminuindo a taxa de positividade geral dos testes. Nesse sentido, a diretriz mais atual da NCCN para Avaliação Genética/Familiar de Alto Risco: Colorretal (v1.2022) recomenda considerar a solicitação de testes genéticos para todos os casos diagnosticados de CCR. Porém, sabemos que a realidade é que a maioria dos países de baixa e média renda está longe de adotar essa abordagem, pois ainda em muitos países até mesmo a realização da triagem universal e posterior encaminhamento para aconselhamento/teste genéticos para

síndrome de Lynch são falhos (148, 149). Assim, a identificação de critérios clínicos e moleculares que aumentam a chance da ocorrência de SPHC para direcionar pacientes para investigação genética, como pacientes dMMR, com mutação somática *KRAS*:G12C, idade precoce e história familiar de CCR, ainda apresentam um importante papel na maioria dos países.

## 10. CONCLUSÃO

Em nossa coorte de 376 pacientes jovens (< 50 anos) com câncer colorretal de uma única instituição observamos que 10,2% dos pacientes foram deficientes para MMR, 21% apresentavam pelo menos um parente de 1º ou 2º grau com CCR e 4,8% tinham critérios clínicos de Amsterdam I/II.

Nesse trabalho fomos capazes de desenvolver com sucesso uma metodologia baseada em NGS para avaliação de metilação no promotor do gene *MLH1*, para caracterizar molecularmente as amostras tumorais do grupo de pacientes com deficiência nos genes de reparo relacionados a causas esporádicas (metilação de *MLH1* e mutação de *BRAF*). O grupo de pacientes com CCR abaixo de 50 anos apresentou mais pacientes negativos para mutação de *BRAF* e/ou metilação de *MLH1* quando comparado ao grupo acima de 50 anos.

Em nossa coorte selecionada para o sequenciamento do painel multi-genes customizado, identificamos variantes germinativas com evidência definitiva de predisposição ao CCR em 1 a cada 4 pacientes, além de termos identificado variantes patogênicas em genes com evidência limitada ou ausente de predisposição hereditária ao câncer CCR, como é o caso dos genes *RAD51C*, *XRCC4* e *FAN1*.

## 11. REFERÊNCIAS

1. Ramamurthy C, Chertock Y, Hall MJ. Randomized Controlled Trials in Hereditary Cancer Syndromes. *Surg Oncol Clin N Am*. 2017 Oct;26(4):729–50.
2. NCCN. Genetic/Familial HighRisk. Natl Compr CANCER Netw NCCN [Internet]. 2017;Version 3.2017. Available from: Available at: [https://www.nccn.org/professionals/physician\\_gls/pdf/genetics\\_colon.pdf](https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/genetics_colon.pdf).
3. Hampel H, Bennett RL, Buchanan A, Pearlman R, Wiesner GL. A practice guideline from the American College of Medical Genetics and Genomics and the National Society of Genetic Counselors: referral indications for cancer predisposition assessment. *Genet Med*. 2015 Jan;17(1):70–87.
4. Nagy R, Sweet K, Eng C. Highly penetrant hereditary cancer syndromes. *Oncogene*. 2004 Aug 23;23(38):6445–70.
5. Lynch HT, Lynch JF, Attard TA. Diagnosis and management of hereditary colorectal cancer syndromes: Lynch syndrome as a model. *CMAJ Can Med Assoc J J Assoc Medicale Can*. 2009 Sep 1;181(5):273–80.
6. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, Booker S, Jen J, Giardiello FM, et al. Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med*. 1993 Dec 30;329(27):1982–7.
7. Knudsen AB, Rutter CM, Meester RGS, Lansdorp-Vogelaar I, Zauber AG, Kuntz KM. Colorectal Cancer Screening in Young Adults. *Ann Intern Med*. 2021 Jul;174(7):1039–40.
8. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*. 2002 Feb;30(2):227–32.
9. Nakagawa H, Nagasaka T, Cullings HM, Notohara K, Hoshijima N, Young J, et al. Efficient molecular screening of Lynch syndrome by specific 3' promoter methylation of the MLH1 or BRAF mutation in colorectal cancer with high-frequency microsatellite instability. *Oncol Rep*. 2009 Jun;21(6):1577–83.
10. GUIDA G D, RENAULT I Z,. *Medicina personalizada e câncer: Os avanços na oncogenética, Inovar Saúde, geneone medicina com precisão*. 2017;
11. Müller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, et al. The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)--results of an international collaborative study. *Fam Cancer*. 2001;1(2):87–92.
12. de Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MGEM, et al. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2004 Feb 1;10(3):972–80.
13. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, 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. :10.
14. Vasen HFA, Möslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*. 2007 Jun;44(6):353–62.
15. Tiwari AK, Roy HK, Lynch HT. Lynch syndrome in the 21st century: clinical perspectives. *QJM Mon J Assoc Physicians*. 2016 Mar;109(3):151–8.
16. Carethers JM, Stoffel EM. Lynch syndrome and Lynch syndrome mimics: The growing complex landscape of hereditary colon cancer. *World J Gastroenterol*. 2015 Aug 21;21(31):9253–61.

17. Jasperson KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010 Jun;138(6):2044–58.
18. Grady WM. Genetic testing for high-risk colon cancer patients. *Gastroenterology*. 2003 May;124(6):1574–94.
19. Valle L. Recent Discoveries in the Genetics of Familial Colorectal Cancer and Polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;15(6):809–19.
20. Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol*. 2019 Apr;247(5):574–88.
21. Seifert BA, McLaughon JL, Jackson SA, Ritter DI, Roberts ME, Schmidt RJ, et al. Determining the clinical validity of hereditary colorectal cancer and polyposis susceptibility genes using the Clinical Genome Resource Clinical Validity Framework. *Genet Med*. 2019 Jul;21(7):1507–16.
22. Chong JX, Buckingham KJ, Jhangiani SN, Boehm C, Sobreira N, Smith JD, et al. The Genetic Basis of Mendelian Phenotypes: Discoveries, Challenges, and Opportunities. *Am J Hum Genet*. 2015 Aug 6;97(2):199–215.
23. American Society of Clinical Oncology Policy Statement Update: Genetic and Genomic Testing for Cancer Susceptibility - PubMed [Internet]. [cited 2022 Oct 9]. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26324357/>
24. Teutsch SM, Bradley LA, Palomaki GE, Haddow JE, Piper M, Calonge N, et al. The Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Initiative: methods of the EGAPP Working Group. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2009 Jan;11(1):3–14.
25. Rehm HL, Berg JS, Brooks LD, Bustamante CD, Evans JP, Landrum MJ, et al. ClinGen--the Clinical Genome Resource. *N Engl J Med*. 2015 Jun 4;372(23):2235–42.
26. Burnett-Hartman AN, Lee JK, Demb J, Gupta S. An Update on the Epidemiology, Molecular Characterization, Diagnosis, and Screening Strategies for Early-Onset Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2021 Mar;160(4):1041–9.
27. Akimoto N, Ugai T, Zhong R, Hamada T, Fujiyoshi K, Giannakis M, et al. Rising incidence of early-onset colorectal cancer — a call to action. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Apr;18(4):230–43.
28. Lupinacci RM. ANÁLISE COMPARATIVA DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, ANÁTOMO-PATOLÓGICAS E SOBREVIDA ENTRE PACIENTES COM CÂNCER COLO-RETAL ABAIXO E ACIMA DE 40 ANOS DE IDADE. 2003;23:9.
29. Campos FGCM, Figueiredo MN, Monteiro M, Nahas SC, Cecconello I. Incidence of colorectal cancer in young patients. *Rev Colégio Bras Cir*. 2017 Apr;44(2):208–15.
30. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, et al. Colorectal cancer statistics, 2017: Colorectal Cancer Statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*. 2017 May 6;67(3):177–93.
31. Pearlman R, Frankel WL, Swanson B, Zhao W, Yilmaz A, Miller K, et al. Prevalence and Spectrum of Germline Cancer Susceptibility Gene Mutations Among Patients With Early-Onset Colorectal Cancer. *JAMA Oncol*. 2017 Apr 1;3(4):464.
32. Stoffel EM, Koeppe E, Everett J, Ulintz P, Kiel M, Osborne J, et al. Germline Genetic Features of Young Individuals With Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2018 Mar;154(4):897-905.e1.
33. Liang JT, Huang KC, Cheng AL, Jeng YM, Wu MS, Wang SM. Clinicopathological and molecular biological

- features of colorectal cancer in patients less than 40 years of age. *Br J Surg*. 2003 Jan 28;90(2):205–14.
34. Mäkelä JT, Kiviniemi H. Clinicopathological features of colorectal cancer in patients under 40 years of age. *Int J Colorectal Dis*. 2010 Jul;25(7):823–8.
  35. Limburg PJ, Harmsen WS, Chen HH, Gallinger S, Haile RW, Baron JA, et al. Prevalence of alterations in DNA mismatch repair genes in patients with young-onset colorectal cancer. *Clin Gastroenterol Hepatol Off Clin Pract J Am Gastroenterol Assoc*. 2011 Jun;9(6):497–502.
  36. Dineen S, Lynch PM, Rodriguez-Bigas MA, Bannon S, Taggart M, Reeves C, et al. A Prospective Six Sigma Quality Improvement Trial to Optimize Universal Screening for Genetic Syndrome Among Patients With Young-Onset Colorectal Cancer. *J Natl Compr Cancer Netw JNCCN*. 2015 Jul;13(7):865–72.
  37. Vasen et al. - 1999 - New clinical criteria for hereditary nonpolyposis .pdf.
  38. Kunitomo et al. 1992.pdf.
  39. De Leon et al. - 1993 - Identification of hereditary nonpolyposis colorect.pdf.
  40. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Srivastava S, Jass JR, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting Highlights and Bethesda Guidelines. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 1997 Dec 3;89(23):1758–62.
  41. Vasen H, Watson P, Mecklin J, Lynch H. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC☆. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453–6.
  42. Vasen H, Watson P, Mecklin J, Lynch H. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC☆. *Gastroenterology*. 1999 Jun;116(6):1453–6.
  43. Rodriguez-Bigas et al. - 1997 - A National Cancer Institute Workshop on Hereditary.pdf.
  44. Boland et al. - A National Cancer Institute Workshop on Microsatel.pdf.
  45. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle A d. I., Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):261–8.
  46. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle A d. I., Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *JNCI J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):261–8.
  47. Evaluation of Genomic Applications in Practice and Prevention (EGAPP) Working Group. Recommendations from the EGAPP Working Group: genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2009 Jan;11(1):35–41.
  48. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med*. 2009 Jan;11(1):42–65.
  49. Provenzale D, Jasperson K, Ahnen DJ, Aslanian H, Bray T, Cannon JA, et al. Colorectal Cancer Screening, Version 1.2015. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015 Aug;13(8):959–68.

50. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG Clinical Guideline: Genetic Testing and Management of Hereditary Gastrointestinal Cancer Syndromes. *Am J Gastroenterol*. 2015 Feb;110(2):223–62.
51. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2014 Aug;147(2):502–26.
52. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Dec 10;26(35):5783–8.
53. Hunter JE, Arnold KA, Cook JE, Zepp J, Gilmore MJ, Rope AF, et al. Universal screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: patient perspectives on screening and sharing results with at-risk relatives. *Fam Cancer*. 2017 Jul;16(3):377–87.
54. Moreira L, Muñoz J, Cuatrecasas M, Quintanilla I, Leoz ML, Carballal S, et al. Prevalence of somatic mutl homolog 1 promoter hypermethylation in Lynch syndrome colorectal cancer: *MLH1* Methylation in Lynch Syndrome CRC. *Cancer*. 2015 May 1;121(9):1395–404.
55. Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, et al. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res*. 1997 Mar 1;57(5):808–11.
56. Issa JP. CpG island methylator phenotype in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004 Dec;4(12):988–93.
57. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Jun 9;95(12):6870–5.
58. Parsons et al. - 2012 - Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1.pdf.
59. Zhang X, Li J. Era of universal testing of microsatellite instability in colorectal cancer. *World J Gastrointest Oncol*. 2013 Feb 15;5(2):12–9.
60. Weissman SM, Burt R, Church J, Erdman S, Hampel H, Holter S, et al. Identification of individuals at risk for Lynch syndrome using targeted evaluations and genetic testing: National Society of Genetic Counselors and the Collaborative Group of the Americas on Inherited Colorectal Cancer joint practice guideline. *J Genet Couns*. 2012 Aug;21(4):484–93.
61. Stastna M, Janeckova L, Hrckulak D, Kriz V, Korinek V. Human Colorectal Cancer from the Perspective of Mouse Models. *Genes*. 2019 Oct 11;10(10):788.
62. Nguyen LH, Goel A, Chung DC. Pathways of Colorectal Carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2020 Jan;158(2):291–302.
63. Grady WM, Pritchard CC. Molecular alterations and biomarkers in colorectal cancer. *Toxicol Pathol*. 2014 Jan;42(1):124–39.
64. Weisenberger et al. - 2018 - DNA methylation aberrancies delineate clinically d.pdf.
65. Feero WG. Clinical application of whole-genome sequencing: proceed with care. *JAMA*. 2014 Mar 12;311(10):1017–9.
66. Ku C, Cooper D, Iacopetta B, Roukos D. Integrating next-generation sequencing into the diagnostic testing of inherited cancer predisposition: Integrating NGS into the diagnostic testing of hereditary cancer. *Clin Genet*.

2013 Jan;83(1):2–6.

67. Oncogenética. Medicina personalizada e câncer: os avanços na. Dra. Ilana Zalcborg\* - PDF Free Download [Internet]. [cited 2022 Oct 12]. Available from: <https://docplayer.com.br/226623392-Oncogenetica-medicina-personalizada-e-cancer-os-avancos-na-dra-ilana-zalcborg.html>
68. Thuler LCS. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA) Coordenação Geral de Ações Estratégicas Coordenação de Educação (CEDC) Rua Marquês de Pombal, 125 – Centro 20230-092 - Rio de Janeiro – RJ Tel.: (21) 3207-5500 [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br). :128.
69. Mikaeel RR, Young JP, Li Y, Smith E, Horsnell M, Uylaki W, et al. Survey of germline variants in cancer-associated genes in young adults with colorectal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2022;61(2):105–13.
70. Vasen HFA, Möslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet*. 2007 Jun;44(6):353–62.
71. Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, Torrezan GT, Santos ÉM, Krepischi AC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. *BMC Med Genet*. 2014 May 15;15(1):55.
72. Aimé A, Coulet F, Lefevre JH, Colas C, Cervera P, Flejou JF, et al. Somatic c.34G>T KRAS mutation: a new prescreening test for MUTYH-associated polyposis? *Cancer Genet*. 2015 Jul;208(7–8):390–5.
73. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med*. 2015 May;17(5):405–24.
74. Newton K, Jorgensen NM, Wallace AJ, Buchanan DD, Lalloo F, McMahon RFT, et al. Tumour *MLH1* promoter region methylation testing is an effective prescreen for Lynch Syndrome (HNPCC). *J Med Genet*. 2014 Dec;51(12):789–96.
75. Adar T, Rodgers LH, Shannon KM, Yoshida M, Ma T, Mattia A, et al. A tailored approach to BRAF and MLH1 methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod Pathol*. 2017 Mar;30(3):440–7.
76. Dong L, Jin X, Wang W, Ye Q, Li W, Shi S, et al. Distinct clinical phenotype and genetic testing strategy for Lynch syndrome in China based on a large colorectal cancer cohort. *Int J Cancer*. 2020 Jun;146(11):3077–86.
77. Wang W, Ying J, Shi S, Ye Q, Zou S, Dong L, et al. A modified screening strategy for Lynch syndrome among MLH1-deficient CRCs: Analysis from consecutive Chinese patients in a single center. *Transl Oncol*. 2021 May;14(5):101049.
78. V S, Bhagat R, C S P, V R P, Krishnamoorthy L. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics*. 2014 Oct;104(4):257–63.
79. Losi L, Fonda S, Saponaro S, Chelbi S, Lancellotti C, Gozzi G, et al. Distinct DNA Methylation Profiles in Ovarian Tumors: Opportunities for Novel Biomarkers. *Int J Mol Sci*. 2018 May 24;19(6):1559.
80. Kahn RM, Gordhandas S, Maddy BP, Baltich Nelson B, Askin G, Christos PJ, et al. Universal endometrial cancer tumor typing: How much has immunohistochemistry, microsatellite instability, and *MLH1* methylation improved the diagnosis of Lynch syndrome across the population? *Cancer*. 2019 Sep 15;125(18):3172–83.
81. Rahner N, Friedrichs N, Steinke V, Aretz S, Friedl W, Buettner R, et al. Coexisting somatic promoter hypermethylation and pathogenic *MLH1* germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol*. 2008 Jan;214(1):10–6.

82. de Paula AE, Galvão H de CR, Bonatelli M, Sabato C, Fernandes GC, Berardinelli GN, et al. Clinicopathological and molecular characterization of Brazilian families at risk for Lynch syndrome. *Cancer Genet.* 2021 Jun;254–255:82–91.
83. Benhamida et al. - 2020 - Reliable Clinical MLH1 Promoter Hypermethylation A.pdf.
84. Mork ME, You YN, Ying J, Bannon SA, Lynch PM, Rodriguez-Bigas MA, et al. High Prevalence of Hereditary Cancer Syndromes in Adolescents and Young Adults With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2015 Nov 1;33(31):3544–9.
85. Lynch et al. - 2015 - Milestones of Lynch syndrome 1895–2015.pdf.
86. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, et al. Risks of Lynch Syndrome Cancers for MSH6 Mutation Carriers. *JNCI J Natl Cancer Inst.* 2010 Feb 3;102(3):193–201.
87. Carneiro da Silva F, Ferreira JR de O, Torrezan GT, Figueiredo MCP, Santos ÉMM, Nakagawa WT, et al. Clinical and Molecular Characterization of Brazilian Patients Suspected to Have Lynch Syndrome. Suzuki H, editor. *PLOS ONE.* 2015 Oct 5;10(10):e0139753.
88. Zhang M, Chen T. Overview on population screening for carriers with germline mutations in mismatch repair (MMR) genes in China. *Hered Cancer Clin Pract.* 2021 Dec;19(1):26.
89. Hechtman JF, Rana S, Middha S, Stadler ZK, Latham A, Benayed R, et al. Retained Mismatch Repair Protein Expression Occurs in Approximately 6% of Microsatellite Instability-High Cancers and is Associated with Missense Mutations in Mismatch Repair Genes. *Mod Pathol Off J U S Can Acad Pathol Inc.* 2020 May;33(5):871.
90. 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 Mar;7(1):41–52.
91. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology.* 2010 May;138(6):2073-2087.e3.
92. Klarskov L, Ladelund S, Holck S, Roenlund K, Lindebjerg J, Elebro J, et al. Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining. *Hum Pathol.* 2010 Oct;41(10):1387–96.
93. Leclerc J, Vermaut C, Buisine MP. Diagnosis of Lynch Syndrome and Strategies to Distinguish Lynch-Related Tumors from Sporadic MSI/dMMR Tumors. *Cancers.* 2021 Jan 26;13(3):467.
94. Carwana H, Hoodfar E, Bergoffen J, Li D. Efficacy of paired tumor and germline testing in evaluation of patients with Lynch-like syndrome in a large integrated healthcare setting. *Fam Cancer.* 2021 Jul;20(3):223–30.
95. Picó MD, Castillejo A, Murcia Ó, Giner-Calabuig M, Alustiza M, Sánchez A, et al. Clinical and Pathological Characterization of Lynch-Like Syndrome. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2020 Feb;18(2):368-374.e1.
96. Martínez-Roca A, Giner-Calabuig M, Murcia O, Castillejo A, Soto JL, García-Heredia A, et al. Lynch-like Syndrome: Potential Mechanisms and Management. *Cancers.* 2022 Feb 22;14(5):1115.
97. Castillejo A, Vargas G, Castillejo MI, Navarro M, Barberá VM, González S, et al. Prevalence of germline MUTYH mutations among Lynch-like syndrome patients. *Eur J Cancer.* 2014 Sep;50(13):2241–50.
98. Elsayed FA, Kets CM, Ruano D, van den Akker B, Mensenkamp AR, Schrupf M, et al. Germline variants in POLE are associated with early onset mismatch repair deficient colorectal cancer. *Eur J Hum Genet EJHG.* 2015 Aug;23(8):1080–4.

99. dos Santos W, de Andrade ES, Garcia FA de O, Campacci N, Sábato C da S, Melendez ME, et al. Whole-Exome Sequencing Identifies Pathogenic Germline Variants in Patients with Lynch-Like Syndrome. *Cancers*. 2022 Jan;14(17):4233.
100. Martínez-Roca et al. - 2022 - Lynch-like Syndrome Potential Mechanisms and Mana.pdf.
101. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer*. 2003 Feb 20;103(5):636–41.
102. Wehner et al. - 2005 - Hereditary nonpolyposis colorectal cancer pitfall.pdf.
103. Momma et al. - 2019 - MLH1 germline mutation associated with Lynch syndr.pdf.
104. Cui S, Zhang X, Zou R, Ye F, Wang Y, Sun J. MLH1 Exon 12 Gene Deletion Leading to Lynch Syndrome: A Case Report. *Oncol Res Treat*. 2021;44(7–8):414–21.
105. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, et al. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet*. 2002 Feb;30(2):227–32.
106. Aimé et al. - 2015 - Somatic c.34GT KRAS mutation a new prescreening .pdf.
107. Morak M, Heidenreich B, Keller G, Hampel H, Laner A, de la Chapelle A, et al. Biallelic MUTYH mutations can mimic Lynch syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2014 Nov;22(11):1334–7.
108. Georgeson P, Harrison TA, Pope BJ, Zaidi SH, Qu C, Steinfeldt RS, et al. Identifying colorectal cancer caused by biallelic MUTYH pathogenic variants using tumor mutational signatures. *Nat Commun*. 2022 Jun 6;13(1):3254.
109. Borrás E, Taggart MW, Lynch PM, Vilar E. Establishing a diagnostic road map for MUTYH-associated polyposis. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 2014 Mar 1;20(5):1061–3.
110. Win AK, Buchanan D, Rosty C, Clendenning M, Spurdle A. Clinical problems of colorectal cancer and endometrial cancer cases with unknown cause of tumor mismatch repair deficiency (suspected Lynch syndrome). *Appl Clin Genet*. 2014 Oct;183.
111. Li Z, Otevrel T, Gao Y, Cheng HL, Seed B, Stamato TD, et al. The XRCC4 gene encodes a novel protein involved in DNA double-strand break repair and V(D)J recombination. *Cell*. 1995 Dec;83(7):1079–89.
112. Jin D, Zhang M, Hua H. Impact of polymorphisms in DNA repair genes XPD, hOGG1 and XRCC4 on colorectal cancer risk in a Chinese Han Population. *Biosci Rep*. 2019 Jan 31;39(1):BSR20181074.
113. Bau DT, Yang MD, Tsou YA, Lin SS, Wu CN, Hsieh HH, et al. Colorectal Cancer and Genetic Polymorphism of DNA Double-strand Break Repair Gene XRCC4 in Taiwan. *ANTICANCER Res*. 2010;4.
114. Terradas M, Capellá G, Valle L. Dominantly Inherited Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Not Caused by MMR Genes. *J Clin Med*. 2020 Jun 23;9(6):1954.
115. Weren RDA, Ligtenberg MJL, Kets CM, de Voer RM, Verwiel ETP, Spruijt L, et al. A germline homozygous mutation in the base-excision repair gene NTHL1 causes adenomatous polyposis and colorectal cancer. *Nat Genet*. 2015 Jun;47(6):668–71.
116. Belhadj S, Quintana I, Mur P, Munoz-Torres PM, Alonso MH, Navarro M, et al. NTHL1 biallelic mutations seldom cause colorectal cancer, serrated polyposis or a multi-tumor phenotype, in absence of colorectal adenomas. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):9020.

117. Magrin L, Fanale D, Brando C, Fiorino A, Corsini LR, Sciacchitano R, et al. POLE, POLD1, and NTHL1: the last but not the least hereditary cancer-predisposing genes. *Oncogene*. 2021 Oct 7;40(40):5893–901.
118. Grolleman JE, de Voer RM, Elsayed FA, Nielsen M, Weren RDA, Palles C, et al. Mutational Signature Analysis Reveals NTHL1 Deficiency to Cause a Multi-tumor Phenotype. *Cancer Cell*. 2019 Feb;35(2):256-266.e5.
119. Li N, Zethoven M, McInerny S, Devereux L, Huang YK, Thio N, et al. Evaluation of the association of heterozygous germline variants in NTHL1 with breast cancer predisposition: an international multi-center study of 47,180 subjects. *NPJ Breast Cancer*. 2021 May 12;7:52.
120. Elsayed FA, Grolleman JE, Ragnathan A, Buchanan DD, van Wezel T, de Voer RM, et al. Monoallelic NTHL1 Loss-of-Function Variants and Risk of Polyposis and Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2020 Dec;159(6):2241-2243.e6.
121. Salo-Mullen EE, Maio A, Mukherjee S, Bandlamudi C, Shia J, Kemel Y, et al. Prevalence and Characterization of Biallelic and Monoallelic *NTHL1* and *MSH3* Variant Carriers From a Pan-Cancer Patient Population. *JCO Precis Oncol*. 2021 Nov;(5):455–65.
122. Espenschied CR, LaDuca H, Li S, McFarland R, Gau CL, Hampel H. Multigene Panel Testing Provides a New Perspective on Lynch Syndrome. *J Clin Oncol*. 2017 Aug 1;35(22):2568–75.
123. Lowstuter K, Espenschied CR, Sturgeon D, Ricker C, Karam R, LaDuca H, et al. Unexpected *CDH1* Mutations Identified on Multigene Panels Pose Clinical Management Challenges. *JCO Precis Oncol*. 2017 Nov;(1):1–12.
124. Roberts ME, Jackson SA, Susswein LR, Zeinomar N, Ma X, Marshall ML, et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. *Genet Med*. 2018 Oct;20(10):1167–74.
125. Seguí N, Mina LB, Lázaro C, Sanz-Pamplona R, Pons T, Navarro M, et al. Germline Mutations in FAN1 Cause Hereditary Colorectal Cancer by Impairing DNA Repair. *Gastroenterology*. 2015 Sep 1;149(3):563–6.
126. Broderick P, Dobbins SE, Chubb D, Kinnersley B, Dunlop MG, Tomlinson I, et al. Validation of Recently Proposed Colorectal Cancer Susceptibility Gene Variants in an Analysis of Families and Patients—a Systematic Review. *Gastroenterology*. 2017 Jan 1;152(1):75-77.e4.
127. Fievet A, Mouret-Fourme E, Colas C, de Pauw A, Stoppa-Lyonnet D, Buecher B. Prevalence of Pathogenic Variants of FAN1 in More Than 5000 Patients Assessed for Genetic Predisposition to Colorectal, Breast, Ovarian, or Other Cancers. *Gastroenterology*. 2019 May;156(6):1919–20.
128. Sánchez-Bermúdez AI, Sarabia-Meseguer MD, García-Aliaga Á, Marín-Vera M, Macías-Cerrolaza JA, Henaréjos PS, et al. Mutational analysis of RAD51C and RAD51D genes in hereditary breast and ovarian cancer families from Murcia (southeastern Spain). *Eur J Med Genet*. 2018;61(6):355–61.
129. Suszynska M, Ratajska M, Kozlowski P. BRIP1, RAD51C, and RAD51D mutations are associated with high susceptibility to ovarian cancer: mutation prevalence and precise risk estimates based on a pooled analysis of ~30,000 cases. *J Ovarian Res*. 2020 May 2;13(1):50.
130. Somyajit K, Subramanya S, Nagaraju G. RAD51C: a novel cancer susceptibility gene is linked to Fanconi anemia and breast cancer. *Carcinogenesis*. 2010 Dec 1;31(12):2031–8.
131. Park JY, Singh TR, Nassar N, Zhang F, Freund M, Hanenberg H, et al. Breast cancer-associated missense mutants of the PALB2 WD40 domain, which directly binds RAD51C, RAD51 and BRCA2, disrupt DNA repair. *Oncogene*. 2014 Oct 2;33(40):4803–12.

132. Pelttari LM, Heikkinen T, Thompson D, Kallioniemi A, Schleutker J, Holli K, et al. RAD51C is a susceptibility gene for ovarian cancer. *Hum Mol Genet.* 2011 Aug 15;20(16):3278–88.
133. Breast Cancer Susceptibility Collaboration (BCSC) (UK), Loveday C, Turnbull C, Ruark E, Xicola RMM, Ramsay E, et al. Germline RAD51C mutations confer susceptibility to ovarian cancer. *Nat Genet.* 2012 May;44(5):475–6.
134. Silvestri V, Rizzolo P, Falchetti M, Zanna I, Masala G, Palli D, et al. Mutation screening of RAD51C in male breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2011 Feb 8;13(1):404.
135. Rizzolo P, Zelli V, Silvestri V, Valentini V, Zanna I, Bianchi S, et al. Insight into genetic susceptibility to male breast cancer by multigene panel testing: Results from a multicenter study in Italy. *Int J Cancer.* 2019;145(2):390–400.
136. Pelttari LM, Nurminen R, Gylfe A, Aaltonen LA, Schleutker J, Nevanlinna H. Screening of Finnish RAD51C founder mutations in prostate and colorectal cancer patients. *BMC Cancer.* 2012 Nov 23;12(1):552.
137. Paulo P, Maia S, Pinto C, Pinto P, Monteiro A, Peixoto A, et al. Targeted next generation sequencing identifies functionally deleterious germline mutations in novel genes in early-onset/familial prostate cancer. Eng C, editor. *PLOS Genet.* 2018 Apr 16;14(4):e1007355.
138. Mur P, Bonifaci N, Díez-Villanueva A, Munté E, Alonso MH, Obón-Santacana M, et al. Non-Lynch Familial and Early-Onset Colorectal Cancer Explained by Accumulation of Low-Risk Genetic Variants. *Cancers.* 2021 Jul 31;13(15):3857.
139. Levine O, Zbuk K. Colorectal cancer in adolescents and young adults: Defining a growing threat. *Pediatr Blood Cancer [Internet].* 2019 Nov [cited 2022 Oct 9];66(11). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/pbc.27941>
140. for the Colon Cancer Family Registry, Shiovitz S, Copeland WK, Passarelli MN, Burnett-Hartman AN, Grady WM, et al. Characterisation of Familial Colorectal Cancer Type X, Lynch syndrome, and non-familial colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014 Jul;111(3):598–602.
141. Nejadtaghi M, Jafari H, Farrokhi E, Samani KG. Familial Colorectal Cancer Type X (FCCTX) and the correlation with various genes—A systematic review. *Curr Probl Cancer.* 2017 Nov;41(6):388–97.
142. Ahnen DJ, Wade SW, Jones WF, Sifri R, Mendoza Silveiras J, Greenamyre J, et al. The Increasing Incidence of Young-Onset Colorectal Cancer: A Call to Action. *Mayo Clin Proc.* 2014 Feb;89(2):216–24.
143. Sawicki T, Ruzkowska M, Danielewicz A, Niedźwiedzka E, Arłukowicz T, Przybyłowicz KE. A Review of Colorectal Cancer in Terms of Epidemiology, Risk Factors, Development, Symptoms and Diagnosis. *Cancers.* 2021 Apr 22;13(9):2025.
144. Schubert SA, Morreau H, de Miranda NFCC, van Wezel T. The missing heritability of familial colorectal cancer. *Mutagenesis.* 2020 Jul 11;35(3):221–31.
145. Garcia FA de O, de Andrade ES, de Campos Reis Galvão H, da Silva Sábado C, Campacci N, de Paula AE, et al. New insights on familial colorectal cancer type X syndrome. *Sci Rep.* 2022 Dec;12(1):2846.
146. Quintana I, Mur P, Terradas M, García-Mulero S, Aiza G, Navarro M, et al. Potential Involvement of NSD1, KRT24 and ACACA in the Genetic Predisposition to Colorectal Cancer. *Cancers.* 2022 Jan;14(3):699.
147. Vaccaro CA, López-Kostner F, Adriana DV, Palmero EI, Rossi BM, Antelo M, et al. From colorectal cancer pattern to the characterization of individuals at risk: Picture for genetic research in Latin America. *Int J Cancer.* 2019 Jul 15;145(2):318–26.

148. Gomes A a. D, Macedo MP, Torrezan GT, Zenun GR, Aguiar S, Begnami MD, et al. DNA Mismatch Repair-Deficient Colorectal Carcinoma: Referral Rate for Genetic Cancer Risk Assessment in a Brazilian Cancer Center. *J Gastrointest Cancer*. 2021 Sep;52(3):997–1002.
149. Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, et al. Hypermethylation of the hMLH1 Promoter in Colon Cancer with Microsatellite Instability1. *Cancer Res*. 1998 Aug 1;58(15):3455–60.
150. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a Small Region of the hMLH1 Promoter Invariably Correlates with the Absence of Gene Expression1. *Cancer Res*. 1999 May 1;59(9):2029–2033.
151. Deng G, Peng E, Gum J, Terdiman J, Sleisenger M, Kim YS. Methylation of hMLH1 promoter correlates with the gene silencing with a region-specific manner in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2002 Feb;86(4):574–9.
152. Medeiros, Ana Beatriz Deleame, et al. "Avaliação de alterações germinativas em MUTYH em pacientes com câncer colorretal e mutação somática KRAS G12C." *Brazilian Journal of Case Reports* 2.Suppl. 1 (2022): 14-14.
153. Magrin L, Fanale D, Brando C, Corsini LR, Randazzo U, Di Piazza M, et al. MUTYH-associated tumor syndrome: The other face of MAP. *Oncogene*. 2022 Apr;41(18):2531–9.

## **ANEXO 1**

### **TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE) RESOLUÇÃO 466/12 CNS/MS**

---

## I - DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO PARTICIPANTE DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

### 1. NOME DO

PARTICIPANTE:.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO:.....

.....Nº..... APTO:.....

BAIRRO: ..... CIDADE:

..... CEP:.....TELEFONE:

(.....) .....

EMAIL:.....

### 2. RESPONSÁVEL LEGAL: .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.):.....

.....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: ..... SEXO : M ( ) F ( )

DATA NASCIMENTO: ...../...../..... ENDEREÇO:.....

..... Nº.....

APTO: .....BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP:.....TELEFONE:(.....).....

EMAIL:.....

---

## II - DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA

### 1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA:

Investigação das causas genéticas de predisposição ao câncer colorretal em idade jovem

### 2. PESQUISADOR RESPONSÁVEL:

Dra. Dirce Maria Carraro

### 3. PESQUISADORES ENVOLVIDOS:

- Dra. Giovana Tardin Torrezan, CIPE - A.C. Camargo Cancer Center
- Dr. Samuel Aguiar, Núcleo de Tumores Colorretais - A.C. Camargo Cancer Center
- Dra. Maria Nirvana da Cruz Formiga, Dept. de Oncogenética - A.C. Camargo Cancer Center
- Dr. Henrique de Campos Reis Galvão, Oncogenética - Hospital do Câncer de Barretos
- Dra. Edenir Inez Palmero, CPOM - Hospital do Câncer de Barretos

### 4. DURAÇÃO DA PESQUISA:

36 meses

---

## III - INFORMAÇÕES AO PARTICIPANTE

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa (“Investigação das causas genéticas de predisposição ao câncer colorretal em idade jovem”), que será realizado no A.C. Camargo Cancer Center, Hospital do Câncer de Barretos e M.D. Anderson Cancer Center e que tem por objetivo compreender quais são as alterações genéticas que podem ocorrer e ser responsável por aumentar o risco para desenvolver tumor colorretal.

Essas alterações genéticas citadas acima são mudanças que podem acontecer no DNA. O

DNA é também conhecido como material genético e se apresenta na forma de um código que é responsável pelo desenvolvimento dos seres vivos e pela transmissão das características e doenças. Quase todas as células do nosso corpo possuem DNA e ele é organizado em várias partes que são chamadas de “genes”.

Quando uma pessoa nasce com alguma alteração genética, ou seja, com alguma falha no código do DNA, e esta falha prejudica o funcionamento de um gene importante, diz-se que a pessoa possui uma alteração genética patogênica. Como consequência dessa falha, a pessoa apresenta uma predisposição (risco maior) de desenvolver alguns tumores, incluindo o tumor colorretal, em outras palavras, pode-se dizer que a pessoa tem uma síndrome de predisposição ao câncer colorretal.

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar desse projeto de pesquisa por um dos seguintes motivos:

1. O(A) senhor(a) teve tumor colorretal antes dos 50 anos de idade e, avaliando o tipo do tumor e sua história pessoal e familiar de saúde, existe a possibilidade de você ter o diagnóstico de síndrome de predisposição ao câncer colorretal.
2. O(A) senhor(a) teve tumor colorretal em qualquer idade e é familiar de uma pessoa que foi diagnosticada com câncer colorretal antes dos 50 anos.

Este documento fornece informações sobre o estudo para o qual o(a) senhor(a) está sendo convidado(a) a participar.

#### **IV – OBJETIVOS DA PESQUISA**

Neste estudo pretende-se avaliar a história pessoal e familiar de saúde (características clínicas) e a ocorrência de alterações genéticas (características genéticas) em indivíduos de três instituições de saúde e pesquisa (A.C. Camargo Cancer Center, Hospital do Câncer de Barretos e M.D. Anderson Cancer Center) que desenvolveram tumor colorretal em idade jovem.

#### **V- JUSTIFICATIVA PARA A PROPOSTA DA PESQUISA**

Estudos anteriores identificaram um grupo de genes que quando têm seu funcionamento prejudicado por alguma alteração genética patogênica, conferem maior risco de desenvolver o tumor colorretal. Porém, existem casos em que apesar de não serem encontradas alterações genéticas patogênicas nesses genes, o tipo do tumor e a história pessoal e familiar de saúde do indivíduo ainda levam a uma suspeita de uma síndrome de predisposição ao câncer. Nesses casos, estudos mais detalhados, buscando por alterações genéticas patogênicas em genes ainda não conhecidos, podem trazer novas descobertas que permitam compreender porque desenvolvemos tumor colorretal. Esse tipo de conhecimento é de grande importância para o direcionamento médico quanto à recomendação de exames laboratoriais para identificação precoce de tumores (exames de rastreamento específicos) e acompanhamento de outros membros da família.

#### **VI – DESENHO DA PESQUISA**

Para realizar este estudo, as informações de saúde pessoal e familiar, incluindo as informações de tumores desenvolvidos serão coletados a partir da revisão do prontuário hospitalar e/ou de comunicação pessoal em consulta de aconselhamento genético (consulta no

Departamento de Oncogenética onde orientações sobre doenças genéticas são passadas). O DNA obtido de amostra de sangue ou saliva será usado para a investigação de alterações genéticas patogênicas. Inicialmente serão avaliados um conjunto de genes através de uma técnica conhecida como “avaliação de painel gênico”. Esses genes já são conhecidos como responsáveis por aumentar o risco de desenvolver câncer colorretal. Se o não forem encontradas alterações genéticas patogênicas nesta avaliação inicial, outros genes serão investigados através de uma técnica conhecida como “avaliação do exoma”, onde um grande número de genes serão avaliados. O método utilizado para os dois exames genéticos citados acima é chamado de “sequenciamento de nova geração”. Esses dados serão registrados, compartilhados entre as instituições participantes e analisados de maneira anonimizada (sem a informação do nome do participante), buscando identificar padrões clínicos e genéticos associados ao câncer colorretal em idade jovem.

## **VII – DESCRIÇÃO DOS PROCEDIMENTOS**

A aceitação do(a) senhor(a) em participar desse estudo, será formalizada através da assinatura deste documento. Se o(a) senhor(a) decidir participar, deverá preencher/assinar esse Termo de Consentimento Livre e Esclarecido onde o(a) senhor(a) autoriza:

- Coletar 2 mL de saliva (1 tubo) para o exame genético. O(a) senhor(a) não poderá ter comido, bebido, fumado ou mastigado chiclete nos 30 minutos que antecede a coleta;

**OU**

- Coletar 8 mL de sangue em frasco contendo anticoagulante EDTA (2 tubos) para o exame genético. Não há necessidade de preparo para essa coleta;

**E**

- Fornecer informação sobre os tumores que o(a) senhor(a) desenvolveu e/ou seus familiares desenvolveram, caso esta informação não seja identificada em seu prontuário hospitalar.

Caso o(a) senhor(a) concorde em participar do estudo, esta será uma colaboração voluntária, não havendo nenhuma forma de remuneração por isto. Do mesmo modo, esta decisão não afeta de nenhum modo o que será cobrado do(a) senhor(a) ou de sua seguradora de saúde. Informamos que não haverá para o(a) senhor(a) custos relacionados a sua participação neste estudo. A coleta de sangue ou saliva poderá ser realizada em qualquer dia em que o(a) senhor(a) estiver no A.C. Camargo Cancer Center. Preferencialmente, contataremos o(a) senhor(a) nas datas que o(a) senhor(a) tiver exames, consultas ou qualquer procedimento médico. Desta forma, o(a) senhor(a) não precisará vir ao hospital apenas para a coleta desta pesquisa e portanto não haverá gastos adicionais referentes ao transporte e alimentação.

As amostras de sangue ou saliva coletadas serão processadas e o DNA extraído será armazenado pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. Toda identificação do seu material será feita por códigos para preservar sua identidade. O DNA será utilizado para a realização dos exames genéticos. Se em seus testes forem identificadas alterações genéticas patogênicas (ou seja, alterações reconhecidamente prejudiciais), o(a) senhor(a) receberá, se estiver de acordo, um laudo contendo explicações sobre as alterações identificadas. Você irá receber o laudo durante consulta de aconselhamento genético com o médico geneticista colaborador deste projeto, que irá explicar detalhadamente as implicações dos resultados encontrados.

## **VIII - DESCONFORTOS E RISCOS ESPERADOS DECORRENTES DO PROCEDIMENTO**

No caso de ser realizada a coleta de sangue, poderá haver alguma dor em decorrência da punção. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local onde a agulha for introduzida geralmente formará uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados, o que diminui as chances de complicações.

Nenhum dano imediato ou tardio, que comprometa a sua saúde, poderá ser decorrente deste estudo, uma vez que você não será submetido a nenhum procedimento adicional aqueles realizados durante o seu tratamento neste hospital. No entanto, se necessário for, garantimos seu direito à assistência gratuita e integral, pelo tempo que for necessário.

Existe a possibilidade de identificarmos alterações genéticas no seu DNA que podem influenciar o seu risco de desenvolver câncer. A detecção destas alterações pode resultar em mudanças na forma como o seu médico te acompanha ao indicar a necessidade de realizar novos exames laboratoriais e ao indicar quais dos seus parentes deveriam iniciar acompanhamento médico específico. O resultado do exame genético pode causar angústias e ansiedade, e para minimizar estes riscos ele é realizado em consulta de aconselhamento genético.

## **IX - BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS**

A maioria dos participantes não se beneficiará diretamente com a participação nesse estudo. Contudo, o estudo contribuirá para um melhor entendimento dos fatores que podem causar o aparecimento do tumor colorretal em idade jovem, desta forma, pode ajudar no desenvolvimento de métodos de diagnóstico e tratamento mais eficazes. Alguns participantes poderão ser beneficiados a partir da identificação de alterações genéticas de aumento de risco para o desenvolvimento de tumores, o que pode resultar em mudanças no acompanhamento médico por exames laboratoriais mais apropriados para estes pacientes.

## **X - CONFIDENCIALIDADE**

Será assegurada a garantia de confidencialidade de seus dados pessoais de identificação. Somente os membros da equipe médica responsável pela sua inclusão neste estudo e os membros do Comitê de Ética em Pesquisa terão acesso aos registros contendo suas seus dados pessoais de identificação. Os dados e documentos serão anonimizados antes de serem encaminhados pela equipe médica responsável para os demais pesquisadores envolvidos neste estudo.

A sua participação neste estudo é voluntária, tendo o direito de retirar-se a qualquer momento. A recusa ou desistência da participação nesse estudo não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

## **XI - DANOS RELACIONADOS À PESQUISA**

Qualquer dano resultante da sua participação no estudo será avaliado e tratado de acordo com os benefícios e cuidados a que você tem direito. Ao assinar este formulário de consentimento você não está abrindo mão de qualquer um dos seus direitos legais, incluindo buscar indenização diante de eventuais danos decorrentes da sua participação nesse estudo.

## **XII - ACOMPANHAMENTO, ASSISTÊNCIA E RESPONSÁVEIS**

Os pesquisadores, médicos e a equipe envolvida na pesquisa se comprometem a dar

informação atualizada ao longo do estudo, caso este seja o seu desejo. TELEFONES PARA CONTATO EM CASO DE INTERCORRÊNCIAS CLÍNICAS OU QUALQUER DÚVIDA SOBRE O ESTUDO: (011) 2189-5000 – ramal 5023, entrar em contato com Dra. Dirce Maria Carraro (pesquisadora).

### XIII - OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES

As amostras coletadas serão processadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center. O excedente, não utilizado por este projeto de pesquisa, poderá ser descartado ou, se autorizado pelo participante, ser armazenado e utilizado em outros projetos, após a aprovação dos mesmos pelo Comitê de Ética em Pesquisa desta Instituição, e quando necessário, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Dependendo da escolha do participante, poderá ser ou não necessária a assinatura de novo TCLE. Para isso, pedimos que o(a) senhor(a) escolha uma das seguintes opções quanto ao armazenamento de sua amostra biológica:

- 1.( ) **Autorizo** o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa.
- 2.( ) **Não autorizo** o armazenamento da minha amostra biológica excedente ao final deste estudo para que a mesma possa ser utilizada em outros protocolos de pesquisa. Desta forma, compreendo que o excedente será inutilizado pelo Biobanco da instituição.

Se você escolheu a resposta do item 1, favor assinalar uma das seguintes opções:

- ( ) **Quero receber** um novo TCLE a cada nova pesquisa realizada no A.C. Camargo Cancer Center.
- ( ) **Não quero receber** um novo TCLE a cada nova pesquisa no A.C. Camargo Cancer Center. Portanto, concordo que este TCLE, uma vez assinado, valerá também para os demais protocolos de pesquisa.

Em casos de óbito ou condições incapacitantes, o(a) senhor(a) tem a possibilidade de ceder os direitos sobre sua amostra biológica armazenada aos seus sucessores ou outras pessoas de sua confiança. Para isso, pedimos que expresse a sua vontade com base nas opções abaixo:

- ( ) Cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas. Favor indicar ao menos 1 (um) nome de pessoa autorizada:

Nome: \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

Nome: \_\_\_\_\_

Grau de Parentesco: \_\_\_\_\_

Telefone: ( ) \_\_\_\_\_

- ( ) Não cedo os direitos sobre minha amostra biológica armazenada nas situações acima referidas.

Em qualquer ocasião e a qualquer tempo, você terá o direito de acesso às informações e resultados obtidos com a utilização de seu material biológico armazenado, recebendo orientações quanto às consequências desse resultado, incluindo aconselhamento genético quando necessário.

A retirada do consentimento de armazenamento da sua amostra biológica excedente no Biobanco poderá ocorrer a qualquer momento e esta solicitação deve ser registrada em um documento e assinada pelo(a) senhor(a). A validade desta solicitação se dará a partir da data de comunicação de sua decisão. A recusa ou desistência do armazenamento de sua amostra não irá prejudicar seu acompanhamento médico e tratamento.

Esta pesquisa poderá ser interrompida durante a sua realização e após o aval do CEP da

instituição, em casos onde: a) O pesquisador responsável decida que algum motivo ou situação possa pôr em risco a segurança do participante ou; b) O CEP julgue que o estudo esteja sendo conduzido de maneira eticamente inaceitável.

#### XIV - QUEM DEVO CONTATAR EM CASO DE DÚVIDAS:

Pesquisador Responsável: Dra. Dirce Maria Carraro  
Laboratório de Genômica e Biologia Molecular do A.C. Camargo Cancer Center -  
São Paulo. Telefones para contato: (11) 2189-5000 ramal 5023  
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo.

Se o pesquisador responsável não fornecer as informações/esclarecimentos suficientes, por favor, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antônio Prudente –

A.C. Camargo Cancer Center pelo telefone (11) 2189-5000, ramal 5020 de segunda-feira à quinta-feira das 8 horas às 18 horas e sexta-feira das 8 horas às 17 horas.

Na impossibilidade de contato com as referências acima, o(a) senhor(a) pode solicitar informações do estudo para a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) através do telefone (61) 3315-2951 / fax (61) 3226-6453 / ou e-mail conep@saude.gov.br.

---

Este documento será elaborado em 2 (duas) vias. O(A) senhor(a) receberá uma das vias originais e a outra será arquivada pelo pesquisador em seu arquivo de pesquisa.

Eu \_\_\_\_\_ declaro ter lido, compreendido e discutido o conteúdo do presente Termo de Consentimento e **concordo em participar desse estudo de forma livre e esclarecida** autorizando os procedimentos acima relacionados:

Assinatura do participante ou responsável legal

Assinatura do responsável pela pesquisa

---

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

---

\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
Data

## Anexo 2

### **Title: Validation of an amplicon based NGS test for assessing *MLH1* promoter methylation and its correlation with *BRAF* mutation in colorectal cancer patients**

Sara Iolanda Oliveira da Silva <sup>1</sup>, Tabata Alves Domingos<sup>2</sup>, Bruna Elisa Catin Kupper<sup>3</sup>, Samuel Aguiar Junior<sup>3</sup>, Dirce Maria Carraro<sup>1,4</sup>, Giovana Tardin Torrezan<sup>#1,4</sup>

1 Genomics and Molecular Biology Group, International Research Center/CIPE, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

2 Anatomic Pathology Department, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil 3 Colorectal Cancer Department, A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil

4 National Institute of Science and Technology in Oncogenomics and Therapeutic Innovation (INCITO), São Paulo, Brazil

**#Corresponding author:** Giovana Tardin Torrezan

Mailing address: 440 Taguá St. São Paulo, SP, 01508-010 Brazil. Phone: +55 (11) 2189-5000 (ext. 2953).

E-mail: [giovana.torrezan@accamargo.org.br](mailto:giovana.torrezan@accamargo.org.br)

**Keywords:** *MLH1* methylation; *BRAF* mutation; Lynch syndrome; mismatch repair deficiency; colorectal cancer

### **Abstract**

Detecting loss of expression of DNA mismatch repair (MMR) proteins is highly relevant to identify Lynch syndrome patients. However, *MLH1* inactivation due to promoter hypermethylation occurs in 15% of sporadic colorectal cancers (CRCs), and it is correlated with *BRAF* somatic mutations. Here, we aimed to develop a diagnostic test for assessing *MLH1* promoter methylation based in next generation sequencing (NGS), and to evaluate the concordance of *MLH1* methylation and *BRAF*-V600 mutation status in CRC. For *MLH1* methylation analysis, DNA from FFPE tumors and saliva was treated with bisulfite, amplified by PCR and evaluated by NGS. Sequence reads were analyzed to evaluate the frequencies of

cytosine/thymine bases of four CpGs. The average percentage of *MLH1* methylation was 2.49% in 20 saliva samples, 2.1% in 6 tumors with *MSH2/MSH6* loss and 29.6% (ranging from 1.0% to 91.3%) in 20 tumors with *MLH1/PMS2* loss. We confirmed the reproducibility and accuracy of *MLH1* promoter analysis performing a serial dilution experiment with completely methylated and unmethylated control DNAs and a comparison between two next generation sequencing platforms (Ion Proton and Illumina). In *MLH1/PMS2* deficient tumors, the *MLH1* methylation status was concordant with the *BRAF* mutation status in 90% (18/20) of the cases. Our amplicon based NGS test showed a great sensitivity and specificity for detecting *MLH1* methylation in CRC samples, with a high agreement with the evaluation of *BRAF* mutation. This simple and affordable test could be used as a reflex test to identify patients with sporadic causes of *MLH1/PMS2* deficiency in CRC and endometrial cancer.

## Background

Colorectal cancers (CRCs) with microsatellite instability (MSI) can be caused by germline mutations in mismatch repair (MMR) genes (*MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*), by somatic methylation of *MLH1* promoter and by somatic mutations in both copies of an MMR genes (Moreira et al 2015). Currently, assessing the MSI and MMR expression status in colorectal cancer patients is of highly importance since these molecular markers have both prognosis and predictive values. Moreover, characterizing the causes of MSI-high and MMR-deficient tumors as germline or sporadic is crucial to identify Lynch syndrome (LS) patients and provide proper follow-up for patients and their relatives.

Expert guidelines recommend universal screening for all newly diagnosed cases of CRC, in order to increase the identification of LS cases, reduce the morbidity and mortality of cancers associated with LS and consequently enable the identification of individuals at risk for hereditary cancer (EGAPP et al. 2009; Palomaki et al. 2009; Provenzale et al. 2016; Syngal et al. 2015; Giardiello et al. 2014; Hampel et al. 2008; EGAPP, 2009; Hurter et al. 2017). However, the most challenging finding in universal screening programs is the lack of expression of *MLH1* (usually accompanied by *PMS2* loss). Most cases with *MLH1* loss are not due to the germline mutation in this gene, but rather to the somatic methylation of its promoter. The *MLH1* gene, like other tumor suppressor genes, is prone to be silenced by promoter methylation in one of the CRC carcinogenesis pathways and around 50% of *MLH1*-

deficient tumors exhibit *MLH1* promoter methylation (Eikenboom et al. 2021). Another important point is that, in CRC, the methylation of the *MLH1* promoter is highly correlated with the presence of *BRAF* V600E somatic mutation (Parson et al. 2012).

Due to its predictive role for some targeted therapies, *BRAF* testing has become routine in the evaluation of CRC. As an advantage, *BRAF* testing is technically less demanding and less costly than assays for *MLH1* promoter methylation analysis. Most used *MLH1* promoter methylation tests are based on methylation-specific PCR (MSP), pyrosequencing or methylation arrays, and these methodologies are not widely available for most clinical diagnostic laboratories. On the other hand, next-generation sequencing (NGS) platforms have become extensively used in oncology diagnostic laboratories, both for germline and somatic analysis. Herein, we developed a simple amplicon based NGS protocol to evaluate *MLH1* promoter methylation, with the intent of using this methodology as a reflex test to identify patients with sporadic causes of *MLH1/PMS2* loss.

## **Methods**

### *Patients*

This study included tumor samples from 20 patients with CRC and known status of *MLH1* and *PMS2* expression by immunohistochemistry. Selected patients had been previously evaluated for *MLH1* and *PMS2* protein expression and, in some cases, for *BRAF* mutations by the Anatomic Pathology Department of the A.C. Camargo Cancer Center (ACC), as part of the universal screening program performed at ACC. Additionally, saliva samples from 20 individuals were included as negative controls. This study was approved by the ACC Internal Ethics Committee Board (2497/18B) and was conducted in compliance with the Declaration of Helsinki.

### *Sample preparation*

For standardization and validation of the methodology, twenty formalin-fixed paraffin- embedded (FFPE) tumor tissue samples from patients with CRC and loss of expression of *MLH1/PMS2* and twenty samples of saliva DNA as negative control were selected. The FFPE tissues were submitted to histological analysis by a pathologist to assess the percentage of tumor cells and mark the tumor areas. Tumor DNA was extracted using

the QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen), following the standard procedures of ACC Biobank.

Saliva samples were collected using Oragene saliva collectors (DNA OG-500, DNA Genotek Inc. Ottawa, Canada). Saliva DNA was extracted in a standardized condition following the established protocol for DNA Extraction and Purification (prepIT L2P-PT-L2P kit, DNA genotek, Inc. Ottawa, Canada). All samples were checked for purity by the NanoDrop spectrophotometric method (ThermoFisher) and quantified using the Qubit dsDNA High Sensitivity (ThermoFisher) fluorimetric method.

#### *Amplicon based NGS of the MLH1 promoter*

Methylation analysis of the *MLH1* gene promoter was performed by amplicon based NGS after tumor DNA conversion using sodium bisulfite. Sodium bisulfite converts unmethylated cytosines (C) to uracil (U), which is replaced by thymine during PCR cycles. Methylated C remains unchanged after treatment.

The *MLH1* promoter site was analyzed between the positions c.-342 to c.-462 of the gene translation start site (positions -143 a -264 of the untranslated region start - NM\_000249.3; LRG\_216), a 121 base pair region that presents five CpGs dinucleotides known to be functionally significant (Deng et al 2004) and that is also evaluated in commercial kits (PyroMark Q24 CpG *MLH1* kit - Qiagen). Specific primers for this region were designed, considering the converted sequence of the region (*MLH1*\_met\_F: AGGTTATAAGAGTAGGGTT; *MLH1*\_met\_R2: AACCYAACTTATATACCTCTACT). For the sodium bisulfite conversion reaction, 20ul of DNA (50 ng), was treated with the EZ DNA Methylation-Gold kit (ZYMO RESEARCH), following the manufacturer's protocol. The converted DNA was submitted to the PCR reaction containing 0.15 uL of Taq High-fidelity (Invitrogen), 1.2 uL of MgSO<sub>4</sub> 50mM, 0.6uL of dNTP 10mM, 5 mM of each primer in a 30 uL reaction. The amplification conditions were as follows: a 2min pre-incubation at 94°C followed by 40 cycles of 30 sec at 94°C, 30 sec at annealing temperature (touchdown protocol starting at 50°C and reduction 0.2°C at each cycle) and one minute at 68°C, with a final 10 min extension at 68°C. PCR products were evaluated on 2% agarose gel. After confirmation of amplification by agarose gel analysis, the remaining volume of the PCR reaction (25uL) was used to construct the amplicon libraries with the Ion Plus Fragment Library kit (Thermo

Fisher), according to the manufacturer's instructions. For sequencing, the emulsion PCR was performed with the Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 kit and the sequencing was performed using the Ion PI™ Hi-Q™ Sequencing 200 Kit and Ion PI™ Chip Kit v3.

The CLC Genomic Workbench software was used to analyze sequence reads and evaluate the methylation ratio in CpG dinucleotides. The generated sequence reads were mapped to a *in silico* converted reference. The frequencies of the C and T bases of five CpGs cytosines and three control cytosines (not CpGs) were annotated and the mean was considered among the four CpGs with the lowest deviation. Initially, the frequencies of C and T bases for the five CpGs sites were evaluated, however it was observed that one of the cytosines had a percentage of methylation that considerably diverged from the others, so it was considered the average among the most stable CpGs. The sodium bisulfite conversion was considered efficient when the average frequency of C bases in the three control cytosines was <2%. The samples were considered positive for *MLH1* methylation when the average frequency of C bases in the 4 CpG cytosines sites was >10%.

#### *Illumina miniSeq sequencing*

The results generated from Ion Proton sequencing were compared with results from Illumina MiniSeq for 9 samples. DNA from 7 FFPE tumors from patients with CRC and loss of expression of *MLH1/PMS2* and 2 control DNAs from saliva were evaluated. PCR products generated with the same protocol as described for Ion Proton were prepared for Illumina sequencing using the QIAseq 1-Step Amplicon Library Kit (Qiagen) and sequenced on the MiniSeq platform (Illumina), according to the manufacturer's instructions. The CLC software was used to analyze sequence reads and evaluate the methylation ratio in CpG dinucleotides, as described for Ion Proton.

#### *Serial dilution with control DNAs*

To evaluate the performance of the methodology used for methylation analysis, we used control DNA samples from fully methylated and fully unmethylated human cell DNA (EpiTect PCR Control DNA Set – Qiagen). For this, six predefined methylation levels were evaluated based on a serial dilution containing respectively: 100% methylated DNA (20ul of 100% methylated DNA), 50% methylated DNA (10ul of 100% methylated DNA + 10ul of 0%

methylated DNA), 25% methylated DNA (10ul of 50% methylated DNA + 10ul of 0% methylated DNA), 12.5% methylated DNA (10ul of 25% methylated DNA + 10ul of 0% methylated DNA), 6.25% methylated DNA (10ul of 12.5% methylated DNA + 10ul of 0% methylated DNA) and 0% methylated DNA (20ul of 0% methylated DNA). Serial dilution samples were submitted to the same bisulfite treatment, PCR protocol, Ion Proton sequencing and analysis as previously described for the tumor and saliva samples.

#### *Somatic mutation analysis of the BRAF gene*

*BRAF* mutation analysis was also performed by NGS to evaluate the p.Val600Glu (V600E) mutation. Specific primers were designed for this codon using the online tool Primer 3 (*BRAF\_V600E\_F*: TTCATGAAGACCTCACAGTAAAAA; *BRAF\_V600E\_R*: GGATCCAGACA ACTGTTCAAA). The DNAs extracted from the tumor FFPE were subjected to PCR reactions containing 12.5 uL of GoTaq® DNA Polymerase, 9.5uL of H<sub>2</sub>O, 5 mM of each primer and 2 uL of DNA (10 to 100ng) in a 25 uL reaction. The amplification conditions were as follows: a 2min pre-incubation at 95°C followed by 35 cycles of 30 sec at 95°C, 1 minute at annealing temperature and 45 sec at 72°C, with a final 5 min extension at 72°C. PCR products were evaluated on 2% agarose gel, and the remaining volume was used to build the amplicon libraries with the Ion Plus Fragment Library kit (Thermo Fisher) and was performed in Ion Proton, as described for *MLH1*. The data generated by the Ion Proton sequencer were analyzed with the Torrent Suit and Variant Caller tools. The criteria for calling variants were minimum coverage of 500 reads and variant allele frequency of at least 2%.

#### *Statistical analysis*

Statistical analyses (correlation and T-test) were performed with GraphPad Prism 5.0 (GraphPad).

## **Results**

#### *MLH1 promoter methylation analysis standardization*

We design specific primers to amplify a 121 base pair region of the *MLH1* promoter



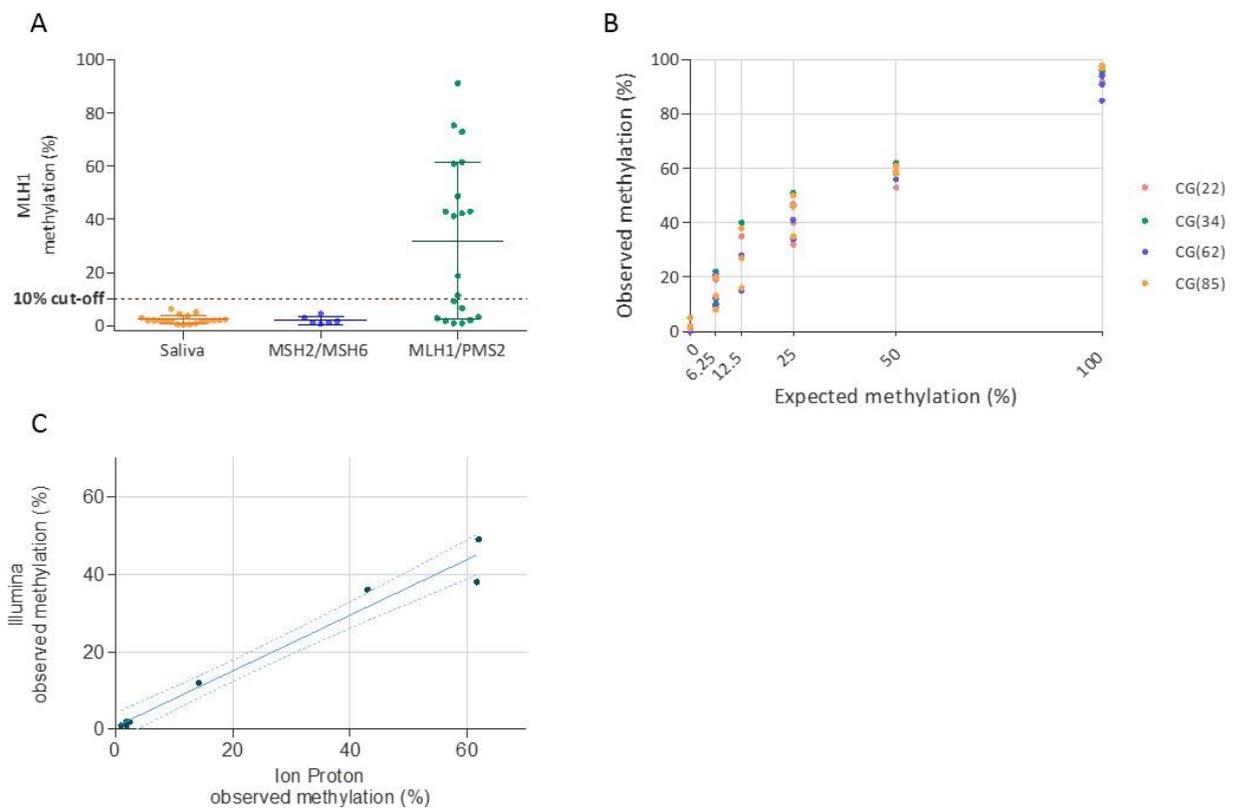
To demonstrate the specificity of the *MLH1* methylation analysis, we tested DNA from 20 saliva samples and 26 tumor samples with immunohistochemistry data showing loss of *MLH1/PMS2* (20 cases) or *MSH2/MSH6* (6 cases) (figure 2A). The average percentage of unconverted cytosines in the control bases was 0.6% (+0.2%), confirming the high efficiency of bisulfite conversion. The average percentage of *MLH1* methylation in the saliva samples was 2.49% (0.5% to 6.4%) and defined the 10% cut-off point to consider a sample as methylated. In tumors with *MSH2/MSH6* loss the rate of *MLH1* methylation ranged from 0.7% to 4.6% (mean 2.1%) and in tumors with *MLH1/PMS2* loss range from 1.0% to 91.3% (mean 29.6%). Only in this last group we detected samples above the 10% cut-off and that were considered positive for *MLH1* methylation.

To verify the reproducibility and accuracy of *MLH1* promoter analysis, we performed a serial dilution analysis and a comparison of results between two next generation sequencing platforms. First, in the serial dilution experiment, we used completely methylated and completely unmethylated control DNAs from human cell lines and generated six samples with different percentage of methylation (100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25% and 0%) (Figure 2B, table 1). Target amplification and library construction were performed in triplicates, and sequencing was performed in the Ion Proton platform. Apart from for the sample with expected methylation of 100%, all other samples showed a mean observed methylation rate higher than expected, with the major difference between expected versus observed appearing in the 25% and 12.5% dilutions. The standard deviation (SD) ranged from 1% to 11.2% between replicates, with the highest SD being observed in dilutions with expected methylation of 25% (SD  $\pm$ 7.9%) and 12.5% (SD  $\pm$ 11.2%).

**Table 1:** Serial dilution and reproducibility analysis.

	Dilutions					
Expected methylation (%)	100.0%	50.0%	25.0%	12.5%	6.25%	0.0%
Replicate 1	90.6%	59.3%	33.9%	15.2%	8.8%	1.6%
Replicate 2	93.8%	57.2%	49.5%	37.6%	20.5%	1.1%
Replicate 3	95.8%	58.9%	43.4%	27.0%	12.5%	3.0%
Mean ( $\pm$ SD)	93.4% (+2.6%)	58.5% (+1.1%)	42.3% (+7.9%)	26.6% (+11.2%)	13.9% (+6.0%)	1.9% ( $\pm$ 1.0%)
Difference expected-observed	6.6%	-8.5%	-17.3%	-14.1%	-7.7%	-1.9%

In the comparative analysis between the two NGS platforms, Ion Proton and Illumina, nine samples with methylation rates ranging from 1% to 62% were evaluated. The percentages of methylation obtained through the Illumina platform were slightly lower than those obtained by the Ion Proton platform (Figure 2C), but there was a high overall correlation between the platforms ( $r=0.97$ ).



**Figure 2. A. *MLH1* methylation analysis in saliva and tumor samples. B. Serial dilution and reproducibility analysis C. Methylation percentage comparison between NGS platforms.** Nine samples were evaluated in Ion Proton and Illumina sequencers.

*Correlation of *MLH1* methylation, *MLH1/PMS2* expression loss and *BRAF* mutation status*

The methylation analysis in *MLH1* promoter was performed with twenty tumor samples with loss of expression of *MLH1/PMS2* (Table 2). Twelve samples showed positive methylation in *MLH1* with methylation percentage ranging from 11.5% to 91.30% and eight

cases were unmethylated. The V600E *BRAF* mutation was detected in ten cases, all of them *MLH1*-methylated, while ten cases were wild-type for *BRAF* V600. The presence of both *MLH1* methylation and *BRAF* mutation agreed in ten cases and the absence of both alterations agreed in eight cases, given an overall concordance of 90% (18/20). Two cases showed absence of *BRAF* mutation and presence of *MLH1* methylation (ID10 and ID20). Interestingly, one of the cases (ID20) presented a germline pathogenic variant (PV) in *MLH1* gene (exons 17-19 deletion), while the second patient (ID10) presented a PV in *MUTYH* (monoallelic).

For 6 of 8 patients who were negative for both *MLH1* methylation and *BRAF* mutation we had germline genetic testing results. Fifty percent (3/6) of these patients were diagnosed with LS with a germline PV in *MLH1* gene. One patient (ID27) who were negative in the germline test had somatic comprehensive genomic testing performed and was confirmed as a Lynch-like patient, due to the detection of a somatic loss of function variant in *MLH1*. Double negative (*MLH1* unmethylated/*BRAF*WT) patients had an earlier age of CRC onset when compared to double positive patients (41.1 versus 63.5,  $p=0.001$ ).

**Table 2.** *MLH1* promoter methylation analysis and V600E *BRAF* mutation in tumors with *MLH1/PMS2* loss.

Sample	Age of onset	Tumor cellularity (%)	<i>MLH1</i> methylation (%)	<i>BRAF</i> mutation	<i>MLH1</i> met / <i>BRAF</i> mut concordant	Germline analysis
ID 01	86	80%	73.0%	V600E	YES	NA
ID 02	65	70%	41.3%	V600E	YES	NA
ID 03	61	65%	43.0%	V600E	YES	NA
ID 04	81	70%	48.8%	V600E	YES	NA
ID 05	61	80%	60.9%	V600E	YES	NA
ID 06	65	70%	42.3%	V600E	YES	NA
ID 07	65	90%	91.3%	V600E	YES	NA
ID 08	61	65%	43.0%	V600E	YES	NA
ID 12	45	95%	61.6%	V600E	YES	NA
ID 19	45	95%	75.4%	V600E	YES	NA
ID 11	36	80%	unmethylated	WT	YES	<i>MLH1</i> path
ID 13	47	60%	unmethylated	WT	YES	<i>MLH1</i> path
ID 23	44	90%	unmethylated	WT	YES	<i>MLH1</i> path
ID 14	44	85%	unmethylated	WT	YES	Negative
ID 26	35	70%	unmethylated	WT	YES	Negative
ID 27 <sup>a</sup>	26	60%	unmethylated	WT	YES	Negative
ID 09	63	30%	unmethylated	WT	YES	NA
ID 17 <sup>b</sup>	34	80%	unmethylated	WT	YES	NA
<b>ID 10</b>	<b>46</b>	<b>80%</b>	<b>18.8%</b>	<b>WT</b>	<b>NO</b>	<b><i>MUTYH</i>pat h<sup>c</sup></b>
<b>ID 20</b>	<b>47</b>	<b>90%</b>	<b>11.5%</b>	<b>WT</b>	<b>NO</b>	<b><i>MLH1</i>path</b>

IHC: immunohistochemistry; WT: wild-type; NA: not available; path: pathogenic.

<sup>a</sup> Somatic mutation in *MLH1* (Lynch-like); <sup>b</sup> Amsterdam I criteria; <sup>c</sup> Monoallelic carrier

## Discussion

In this study, we developed and validated a simple, uncostly, quantitative, NGS based test to evaluate *MLH1* promoter methylation. We showed the test had a high specificity, with the detection of *MLH1* methylation above the cut-off of 10% being observed only in *MLH1/PMS2* deficient tumors and in none of *MSH2/MSH6* deficient tumors or saliva samples. Also, we demonstrated a high concordance (90%) of *MLH1* methylation status to somatic *BRAF*-V600E mutation in CRC samples of Brazilian patients.

The concordance between these two markers in CRC tumors have been widely investigated in other studies and populational differences between their co-occurrence have

been described. Data from Western countries showed concordance rates of 81-83% (Newton et al. 2014; Adar et al 2017). On the other hand, studies on Chinese CRC patients observed an overall smaller frequency of *BRAF* mutations in CRC tumors, with only 15%-17% of patients with *MLH1* loss presenting *BRAF*-V600E mutation and 45% of *BRAF*-negative patients being positive for *MLH1* methylation, leading to a concordance of around 60% between both markers (Dong et al 2020; Wang et al 2021).

This data shows that *MLH1* promoter methylation can significantly improve the identification of the underlying cause of sporadic *MLH1*-deficient tumors. This identification is important, as it can assist genetic counseling and prevent further unnecessary molecular tests, such as somatic sequencing of MMR genes. In this sense, the current NCCN guidelines for Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal (Version: 1.2021) recommend that cases with abnormal MMR expression, negative for *BRAF* mutations and for germline pathogenic variants should be evaluated for *MLH1* tumor methylation, to confirm or refute a sporadic CRC. Moreover, testing for *MLH1* methylation is also important in the context of endometrial carcinoma, since in this tumor type no other somatic biomarker can indicate *MLH1* methylation, and thus a sporadic MMR deficient tumor (Shilpa et al. 2014; Losi et al. 2018). Indeed, in EC the frequency of *MLH1/PMS2* deficient tumors is around 20%, and more than 85% of these tumors are positive for *MLH1* methylation (Kahn et al 2019).

One interesting finding of our study was the identification of a Lynch Syndrome patient harboring somatic *MLH1* promoter methylation. This patient was a carrier of a germline large deletion in *MLH1* (exons 17-19), had a *MLH1* methylation ratio of 11% and absence of mutations in *BRAF*. Other studies have also described *MLH1* methylated tumors in LS patients (Rahner et al 2008, Wang et al 2021, de Paula et al 2021), with one of the largest studies describing that up to 5.6% of LS CRC tumors harbor *MLH1* methylation (Newton et al. 2014). On the other hand, *BRAF* mutation has more rarely been described in LS patients, what suggests that tumor *BRAF* status is more sensitive than *MLH1* tumor methylation status as a negative predictor of MMR genes germline mutation status.

In our serial dilution experiment, we observed that all dilutions below 100% methylated DNA presented a methylation ratio higher than expected and that intermediate levels of methylation presented higher variation between triplicates. These could possibly be explained by differences in stability or amplification ratios between methylated and

unmethylated DNA strands. Remarkably, these results are similar to those described by Benhamida et al. 2020 in their study evaluating *MLH1* promoter methylation using a Genome-Wide Methylation Array Platform. Although these results preclude considering our test a true quantitative assay, the cut-off established as 10% for a dichotomic classification (methylated x unmethylated) showed an excellent performance.

Defining *MLH1* expression status in CRC and EC is now part of the clinical diagnostic routine in most cancer specialized hospitals. In CRC, the identification of a patient with a *MLH1*-deficient tumor should be followed by either *BRAF* mutation analysis or *MLH1* promoter methylation analysis and, for EC, *MLH1* methylation analysis only, to identify patients more likely to have somatic causes for *MLH1* deficiency. For negative patients, follow-up with a geneticist and genetic testing is recommended and likely germline genetic testing. Despite its defined relevance, the investigation of *MLH1* promoter methylation is not widely available in molecular diagnostics laboratories and its use in clinical routine is still underemployed. Since most molecular laboratories today have NGS sequencing platforms, an NGS-based test to evaluate *MLH1* promoter methylation could be easily implemented in most clinical laboratories that perform molecular tests for oncology.

## **Conclusions**

Our results showed a great sensitivity and specificity for detecting *MLH1* methylation with this amplicon based NGS test and a high agreement between the presence/absence of *BRAF* mutations and *MLH1* methylation in CRC samples. This test that could be used as a reflex test to identify patients with sporadic causes of *MLH1/PMS2* deficiency in CRC and endometrial cancer, and as consequence to select negative patients that should be referred for genetic counseling and germline testing.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We acknowledge the patients who participated in the study, and the A.C. Camargo biobank for sample processing.

## **CONFLICT OF INTEREST**

The authors declare no potential conflict of interest.

**FINANCIAL SUPPORT:** Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (2014/509443-1), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (465682/2014-6) and CAPES (88887.136405/2017-00).

## References

1. EGAPP WORKING GROUP. *Recommendations from the EGAPP Working Group: Genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. Genet Med* 2009.
2. PALOMAKI GE, MCCLAIN MR, MELILLO S, HAMPEL HL, THIBODEAU SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. **Genet Med.** 2009, 11(1):42–65
3. DENG G, BELL I, CRAWLEY S, GUM J, TERDIMAN JP, ALLEN BA, TRUTA B, SLEISENGER MH, KIM YS. *BRAF* mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated *hMLH1*, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):191–5.
4. PROVENZALE D, JASPERSON K, AHNEN DJ, et al (2016) Genetic/familial high-risk assessment: colorectal SYNGAL S, BRAND RE, CHURCH JM, GIARDIELLO FM, HAMPEL HL, BURT RW. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *Am J Gastroenterol.* 2015, 110(2):223–262
5. GIARDIELLO FM, ALLEN JI, AXILBUND JE, et al. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-society Task Force on colorectal cancer. *Am J Gastroenterol.* 2014, 109(8):1159–1179

6. HAMPEL H, FRANKEL WL, MARTIN E, et al. (2008). Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol* 26(35):5783–5788
7. HUNTER JE, ARNOLD KA, COOK JE, ZEPP J, GILMORE MJ, et al. Universal screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer: Patient perspectives on screening and sharing results with at-risk relatives. *Fam Cancer* 2017.
8. ELLIS L, EIKENBOOM, ANNE-SOPHIE VAN DER WERF-T LAM, MAR RODRÍGUEZ-GIRONDO, CHRISTI J. VAN ASPEREN, WINAND N.M. DINJENS, ROBERT M.W. HOFSTRA, MONIQUE E. VAN LEERDAM, HANS MORREAU, MANON C.W. SPAANDER, ANJA WAGNER, MAARTJE NIELSEN. Universal Immunohistochemistry for Lynch Syndrome: A Systematic Review and Meta-analysis of 58,580 Colorectal Carcinomas, *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, Volume 20, Issue 3, 2022, Pages e496- e507, ISSN 1542-3565, <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2021.04.021>.
9. NEWTON K, JORGENSEN NM, WALLACE AJ, ET AL. Tumour *MLH1* promoter region methylation testing is an effective prescreen for Lynch Syndrome (HNPCC) *Journal of Medical Genetics* 2014;51:789-796.
10. PARSONS MT, BUCHANAN DD, THOMPSON B, YOUNG JP, SPURDLE AB. Correlation of tumour *BRAF* mutations and *MLH1* methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet.* 2012 Mar;49(3):151-7. doi: 10.1136/jmedgenet-2011-100714. PMID: 22368298.
11. DENG G, BELL I, CRAWLEY S, GUM J, TERDIMAN JP, ALLEN BA, TRUTA B, SLEISENGER MH, KIM YS. *BRAF* mutation is frequently present in sporadic colorectal cancer with methylated *hMLH1*, but not in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(1 Pt 1):191–5

12. ADAR T, RODGERS LH, SHANNON KM, YOSHIDA M, MA T, MATTIA A, LAUWERS GY, IAFRATE AJ, CHUNG DC. A tailored approach to *BRAF* and *MLH1* methylation testing in a universal screening program for Lynch syndrome. *Mod Pathol.* 2017 Mar;30(3):440-447. doi: 10.1038/modpathol.2016.211. Epub 2017 Jan 6. PMID: 28059100.
13. WANG W, YING J, SHI S, YE Q, ZOU S, DONG L, LYU N. A modified screening strategy for Lynch syndrome among *MLH1*-deficient CRCs: Analysis from consecutive Chinese patients in a single center. *Transl Oncol.* 2021 May;14(5):101049. doi: 10.1016/j.tranon.2021.101049. Epub 2021 Mar 3. PMID: 33676177; PMCID: PMC7933804.
14. V S, BHAGAT R, C S P, V R P, KRISHNAMOORTHY L. Microsatellite instability, promoter methylation and protein expression of the DNA mismatch repair genes in epithelial ovarian cancer. *Genomics.* 2014 Oct;104(4):257-63. doi: 10.1016/j.ygeno.2014.08.016. Epub 2014 Sep 2. PMID: 25192888.
15. LOSI, L.; FONDA, S.; SAPONARO, S.; CHELBI, S.T.; LANCELLOTTI, C.; GOZZI, G.; ALBERTI, L.; FABBIANI, L.; BOTTICELLI, L.; BENHATTAR, J. Distinct DNA Methylation Profiles in Ovarian Tumors: Opportunities for Novel Biomarkers. *Int. J. Mol. Sci.* **2018**, *19*, 1559. <https://doi.org/10.3390/ijms19061559>
16. Kahn RM, Gordhandas S, Maddy BP, Baltich Nelson B, Askin G, Christos PJ, Caputo TA, Chapman-Davis E, Holcomb K, Frey MK. UNIVERSAL endometrial cancer tumor typing: How much has immunohistochemistry, microsatellite instability, and *MLH1* methylation improved the diagnosis of Lynch syndrome across the population? *Cancer.* 2019 Sep 15;125(18):3172-3183. doi: 10.1002/cncr.32203. Epub 2019 May 31. PMID: 31150123.
17. RAHNER N, FRIEDRICHS N, STEINKE V, ARETZ S, FRIEDL W, BUETTNER R, MANGOLD E, PROPPING P, WALLDORF C. Coexisting somatic promoter hypermethylation and

pathogenic *MLH1* germline mutation in Lynch syndrome. *J Pathol.* 2008 Jan;214(1):10-6. doi: 10.1002/path.2263. PMID: 17973250.

18. ANDRÉ ESCREMIM DE PAULA, HENRIQUE DE CAMPOS REIS GALVÃO, MURILO BONATELLI, CRISTINA SABATO, GABRIELA CARVALHO FERNANDES, GUSTAVO NORIZ BERARDINELLI, CARLOS EDUARDO MATTOS ANDRADE, MAXIMILIANO CADAMURO NETO, LUIS GUSTAVO CAPOCHIM ROMAGNOLO, NATALIA CAMPACCI, CRISTOVAM SCAPULATEMPO-NETO, RUI MANUEL REIS, EDENIR INÊZ PALMERO. Clinicopathological and molecular characterization of Brazilian families at risk for Lynch syndrome, *Cancer Genetics*, Volumes 254–255,2021, Pages 82-91,ISSN 2210-7762,https://doi.org/10.1016/j.cancergen.2021.02.003.
  
19. BENHAMIDA JK, HECHTMAN JF, NAFA K, VILLAFANIA L, SADOWSKA J, WANG J, WONG D, ZEHIR A, ZHANG L, BALE T, ARCILA ME, LADANYI M. Reliable Clinical *MLH1* Promoter Hypermethylation Assessment Using a High-Throughput Genome-Wide Methylation Array Platform. *J Mol Diagn.* 2020 Mar;22(3):368-375. doi: 10.1016/j.jmoldx.2019.11.005. Epub 2019 Dec 24. PMID: 31881335; PMCID: PMC7103764.