



LIDIANE CAMILA RUEDA

**“Investigação de mutações nos genes *MLH1* e
MSH2 em portadores de Câncer Colorretal
Hereditário sem Polipose (HNPCC)”**

CAMPINAS
2013



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS

LIDIANE CAMILA RUEDA

**“Investigação de mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* em portadores
de Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC)”**

Orientadora: Prof^ª. Dr.^a. Carmen Sílvia Bertuzzo

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade de Campinas para
obtenção de título de Doutora em Ciências, área de concentração Clínica Médica.

**ESTE EXEMPLAR CORRESPONDE À VERSÃO FINAL DA TESE
DEFENDIDA PELA ALUNA LIDIANE CAMILA RUEDA E
ORIENTADA PELA PROF.^A. DR.^A. CARMEN SÍLVIA BERTUZZO.**

Assinatura do Orientador

CAMPINAS
2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
MARISTELLA SOARES DOS SANTOS – CRB8/8402
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP

R836i Rueda, Lidiane Camila, 1982-
Investigação de mutações nos genes MLH1 e MSH2
em portadores de Câncer Colorretal Hereditário sem
Polipose (HNPCC) / Lidiane Camila Rueda. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2013.

Orientador : Carmen Sílvia Bertuzzo.
Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Gene MLH1. 2. Gene MSH2. 3. Câncer colorretal
hereditário sem polipose. 4. Síndrome de Lynch. I.
Bertuzzo, Carmen Sílvia, 1963-. II. Universidade
Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: Investigation of mutations in MLH1 and MSH2 genes in carriers with
Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (HNPCC)

Palavras-chave em inglês:

Gene, MLH1

Gene, MSH2

Colorectal neoplasms, Hereditary nonpolyposis

Lynch Syndrome

Área de concentração: Clínica Médica

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Carmen Sílvia Bertuzzo [Orientador]

Mônica Barbosa de Melo

Carlos Eduardo Steiner

Mithitaka Soma

Marilda de Souza Gonçalves

Data da defesa: 24-05-2013

Programa de Pós-Graduação: Clínica Médica

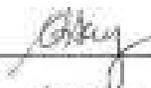
BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

LIDIANE CAMILA RUEDA

Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

MEMBROS:

1. PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO



2. PROF(A). DR(A). MÔNICA BARBOSA DE MELO



3. PROF(A). DR(A). CARLOS EDUARDO STEINER



4. PROF(A).DR(A). MITHITAKA SOMA



5. PROF(A).DR(A). MARILDA DE SOUZA GONÇALVES



Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Ciências Médicas da
Universidade Estadual de Campinas

Data: 24 de maio de 2013

Dedicatória

Dedico este trabalho a todos da família Rueda,
a minha mãe Lourdes que sempre me encorajou e ao
meu esposo Evguen, por tudo.

Agradecimentos

A *Deus* toda honra e glória.

À *Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo* pela oportunidade valiosa de trilhar o caminho da ciência, pela orientação conferida, além da amizade e apoio.

À *Profa. Dra. Marilda de Souza Gonçalves*, ao *Prof. Dr. Mithitaka Soma*, ao *Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner*, à *Profa. Dra. Mônica Barbosa de Melo* obrigada por aceitarem analisar e avaliar este trabalho. Minha grande admiração.

Aos queridos *Dr. Fabio Rossi Torres* e à *Profa. Dra. Cláudia Vianna Morelli Maurer* por toda ajuda dispensada.

Ao *Prof. Dr. Cláudio Coy* pelos ensinamentos no ambulatório.

Ao *Fernando Marson* e *Rodrigo Secolin* pelas análises estatísticas.

A todo pessoal do laboratório de Genética Molecular pela convivência.

Aos meus amigos do laboratório por me acolherem, pelo carinho, amizade e ajuda de sempre: *Luciana, Tammy, Madalena, Fábio Conti, Daniel Zanetti, Nailu, Karina, Renato, Alexandre, Marilza* e *Milena*.

Às amigas vizinhas de laboratório *Natássia* e *Helen* pelas conversas, dicas e amizade.

À amiga *Daniela Furgeri* por toda a companhia, amizade e carinho e à amiga *Cláudia Estela Gonçalves* pela imensurável amizade e apoio incondicional destes anos.

À Universidade Estadual de Campinas.

Aos pacientes e seus familiares que constituíram os dados desta pesquisa e tornaram possível esta investigação.

À *Capes* e à *Fapesp* pelo apoio financeiro.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

Em especial...

Ao *Evguen Rosada* meu esposo, pelo enorme apoio e ajuda durante estes anos, pela paciência, carinho, companheirismo e amor.

À minha mãe *Maria de Lourdes* pelo apoio, pelas palavras de incentivo e amor de sempre.

À minha irmã *Luciana*, que só pelo olhar transmitia toda sua torcida e carinho.

As minhas sobrinhas *Fernanda* e *Beatriz* por me alegrarem todo o momento e pelo amor que é insubstituível e ao cunhado *Edson* por todo apoio.

Às famílias *Nicoletto*, *Rosada* e *Paschoaletto* pelo carinho.

Aos amigos da IPIL pelo apoio.

A todos da família *Rueda* minha gratidão, pois este trabalho tem um pouco de cada um e é dedicado a vocês.

Lista de abreviaturas	xvii
Lista de tabelas.....	xix
Lista de figuras	xxi
Lista de quadros	xxiii
Lista de gráficos.....	xxv
<i>Resumo</i>	xxvii
<i>Abstract</i>	xxxiii
1. INTRODUÇÃO	39
1.1 Epidemiologia.....	41
1.2 Aspectos Clínicos.....	44
1.3 Patologia do CCR	48
1.3.1 Seqüência adenoma-carcinoma.....	49
1.4 Aspectos ambientais	51
1.5 Aspectos Genéticos	53
1.5.1 CCR Hereditário.....	53
1.5.1.1 Genes de reparo do DNA (Mismatch Repair- MMR).....	58
1.5.2 Genes.....	62
1.5.2.1 hMLH1	62
1.5.2.2 hMSH2	63
1.6 Tratamento e Seguimento da SL	64
2. OBJETIVOS	67
3. MÉTODOS	71
3.1. Casuística.....	73
3.2. Métodos	74
3.2.1. Extração de DNA.....	74
3.2.2. PCR	75
3.2.3. Sequenciamento Automático.....	80
3.3. Análise dos dados.....	81
3.4. Análise Estatística.....	81

4. RESULTADOS.....	83
4.1. Análise Familiar.....	98
5. DISCUSSÃO	105
5.1. Fase I.....	107
5.2. Fase II.....	111
5.2.1. Família I	111
5.2.2. Família II	115
6. CONCLUSÕES	117
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
8. ANEXOS	137

Lista de abreviaturas

AA	Aminas aromáticas
CCR	Câncer colorretal
DNA	Ácido desoxirribonucleíco
dNTP	Desoxirribonucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
HAP	Hidrocarbonetos aromáticos policíclicos
HCl	Ácido clorídrico
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose
IC	Intervalo de confiança
INCA	Instituto Nacional do Câncer
mg	Miligrama
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
ml	Mililitro
mM	Milimolar
NaCl	Cloreto de sódio
OR	Razão de prevalência
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
rpm	Rotação por minuto
SL	Síndrome de Lynch
Taq	<i>Termus aquaticus</i>
μL	Microlitro

Lista de tabelas

	PÁG.
Tabela 1: Sequência dos iniciadores do gene <i>MLH1</i> utilizados para amplificação gênica.....	78
Tabela 2: Sequência dos iniciadores do gene <i>MSH2</i> utilizados para amplificação gênica.....	79
Tabela 3: Descrição dos pacientes com câncer de colorretal de acordo com as variáveis: sexo, etnia, idade do diagnóstico, estadiamento e grau de diferenciação do tumor; e descrição das mutações identificadas nos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	86
Tabela 4: Distribuição dos pacientes com câncer de colorretal pelo sexo e etnia de acordo com presença de mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> versus <i>MSH2</i>	93
Tabela 5: Distribuição dos pacientes com câncer de colorretal pelo TNM e Astler-Coller de acordo com presença de mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> versus <i>MSH2</i>	94
Tabela 6: Distribuição dos pacientes com câncer de colorretal pelo grau de diferenciação do tumor de acordo com presença de mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> versus <i>MSH2</i>	95
Tabela 7: Distribuição dos pacientes com câncer de colorretal pelo TNM, Astler-Coller grau de diferenciação do tumor de acordo com presença de mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> versus <i>MSH2</i>	96
Tabela 8: Associação dos pacientes com o tempo de diagnóstico do câncer de colorretal com a presença de mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene <i>MLH1</i> versus <i>MSH2</i>	97
Tabela 9: Resultado das análises dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> na família I.....	101
Tabela 10: Resultado das análises dos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> no indivíduo 6 da família II.....	103

Lista de figuras

	PÁG.
Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)	42
Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto).....	43
Figura 3: Cólon: anatomia geral e tumor invadindo.....	45
Figura 4: Sistema TNM descreve a extensão clínica do tumor.....	47
Figura 5: Estágios do tumor.....	47
Figura 6: Evolução anatômica da sequência adenoma- carcinoma.....	50
Figura 7: Estrutura da sequência adenoma-carcinoma.....	50
Figura 8: Modelo do Sistema de Reparo de “Mismatch”.....	61
Figura 9: Fluxograma da casuística analisada.....	74
Figura 10: Ciclo utilizado na reação de sequenciamento.....	80
Figura 11: Eletroferograma da mutação missense (c.655A>G) éxon 8 do gene <i>MLH1</i>	85
Figura 12: Heredograma da família I.....	99
Figura 13: Heredograma da família II.....	102

Lista de quadros

	PÁG.
Quadro 1: Sistema TNM.....	46
Quadro 2: Estadiamento Clínico.....	46
Quadro 3: Critérios de Amsterdã para o diagnóstico clínico de HNPCC.....	54
Quadro 4: Critérios de Amsterdã para o diagnóstico clínico de HNPCC	55
Quadro 5: Critérios de Amsterdã II para o diagnóstico clínico de HNPCC	55
Quadro 6 Critérios de Bethesda revisados, visando a identificação de indivíduos candidatos aos testes de rastreamento para a SL.....	56

Lista de gráficos

	PÁG.
Gráfico 1: Distribuição das mutações no gene <i>MLH1</i> por éxons acometidos e por tipo de mutação, reportados da literatura.....	62
Gráfico 2: Distribuição das mutações no gene <i>MSH2</i> por éxons acometidos e por tipo de mutação, reportados da literatura.....	63

Resumo

O câncer colorretal tem importância elevada frente a sua incidência e morbidade. Dentre os casos hereditários, o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), ou Síndrome de Lynch, é responsável por cerca de 5% do total de casos. No HNPCC, a alteração genética herdada é a inativação de um dos alelos dos genes envolvidos em reparo do DNA, sendo os principais os genes *hMLH1* e *hMSH2*.

O objetivo deste trabalho foi investigar, em indivíduos com diagnóstico clínico de HNPCC, a presença de mutações nos genes *MLH1* e *MSH2*, associar as variáveis clínicas com o gene mutado e investigar os familiares de portadores de HNPCC aos quais tivemos acesso, com relação a mutações germinativas.

A investigação das mutações foi realizada por meio de sequenciamento direto dos éxons, região promotora e regiões de junção.

Foram analisados 65 indivíduos divididos em três grupos, sendo (I) 46 pacientes portadores de câncer colorretal inclusos nos Critérios de Amsterdã, (II) dois familiares portadores de câncer colorretal e (III) 17 familiares sem câncer, todos da região metropolitana de Campinas, atendidos no Hospital de Clínicas da UNICAMP.

Em 21 (45,65%) dos pacientes foram encontradas mutações deletérias. As mutações deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2* estavam na proporção de 34,78% (16 pacientes) e 10,86% (5 pacientes), respectivamente. As mutações não deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2* estavam na proporção de 65,22% dos pacientes (30 alterações) e 50% dos pacientes (23 alterações), respectivamente.

Foi possível identificar 23 mutações potencialmente deletérias entre os pacientes com HNPCC por meio de sequenciamento dos genes *MLH1* e *MSH2*, com uma porcentagem de detecção de 50%.

Parece não haver variações nas características clínicas do tumor quando a mutação germinativa ocorre no gene *MLH1* ou *MSH2*, com exceção da relação entre presença de mutação no gene *MLH1* e idade de manifestação da doença.

Como ocorre no resto do mundo a doença mostrou-se extremamente heterogênea em termos moleculares, pois apenas duas mutações se repetiram em dois pacientes.

A partir da análise das duas famílias foi possível mostrar a dificuldade para estabelecer a presença da mutação germinativa deletéria que poderia levar à predisposição ao HNPCC, bem como a importância da análise familiar no diagnóstico molecular dessa alteração.

*A*bstract

Colorectal cancer has high importance because of its incidence and morbidity. Among the hereditary cases, the hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) or Lynch syndrome, accounts for about 5% of cases. In HNPCC, the genetic alteration inherited is the inactivation of one of the alleles of genes involved in the DNA repair, being *hMSH2* and *hMLH1* the main genes.

The objective of this study is to investigate the presence of mutations in *MLH1* and *MSH2* in patients with clinical diagnosis of HNPCC, correlate clinical variables with the mutated gene, and investigate the relatives of patients with HNPCC who we had access to, in relation to germline mutations.

Investigation of the mutations was performed by exons direct sequencing, the promoter and junction regions.

Sixty-five individuals, divided into three groups, were studied: (I) 46 patients with colorectal cancer included in the Amsterdam Criteria, (II) two family members of colorectal cancer patients and (III) 17 relatives without cancer, all of them treated at Hospital das Clínicas at UNICAMP and living in the Campinas metropolitan area.

Deleterious mutations were found in 21 patients (45.65%). The ratio of deleterious mutations in *MLH1* and *MSH2* was 34.78% (16 patients) and 10.86% (5 patients) respectively. The ratio of non deleterious mutations in genes *MLH1* and *MSH2* was 65.22% of patients (30 alterations) and 50% of patients (23 alterations) respectively.

Among patients with HNPCC, 23 potentially deleterious mutations were identified, via sequences of *MLH1* and *MSH2* with a 50% detection rate.

It doesn't seem to appear variations in the clinical characteristics of the tumor when a germline mutation occurs in *MLH1* or *MSH2*, with the exception of the relationship between the presence of mutation in the *MLH1* gene and age of disease onset.

As it occurs throughout the world, the disease present a his molecular extremely heterogeneity, where only two mutations were repeated in two patients.

The analysis of the two families demonstrated not only the difficulty to establish the presence of deleterious germline mutation that could lead to a predisposition to of HNPCC, but also the importance of familial analysis in molecular diagnostics of this alteration.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

Acredita-se que o câncer humano ocorra devido a anormalidades que conferem vantagens a algumas células, que são transmitidas às células filhas dando origem a um clone celular que escapa aos controles de crescimento e de diferenciação (Namba *et al.*, 1990). O câncer é considerado um dos principais problemas da saúde pública mundial (Boyle e Langman, 2000).

No Brasil, em 2012, estimou-se 14.180 casos novos de câncer colorretal (CCR) em homens e 15.960 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 15 casos novos a cada 100 mil homens e 16 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2013).

Sem considerar os tumores da pele não melanoma, o CCR em homens é o segundo mais frequente na região Sudeste (22/100 mil) e o terceiro nas regiões Sul (18/100 mil) e Centro-Oeste (14/100 mil). Na região Norte (4/100 mil), ocupa a quarta posição e, na região Nordeste (5/100 mil), a quinta (Figura 1). Para as mulheres (Figura 2), é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (23/100 mil) e Sul (20/100 mil), o terceiro nas regiões Centro-Oeste (15/100 mil) e Nordeste (7/100 mil), e o sexto na região Norte (5/100 mil) (INCA, 2013).

Nos últimos anos, a incidência do CCR parece constante em áreas de alto risco representadas pelos países desenvolvidos e parece aumentar em áreas antes consideradas de baixo risco, como o Japão e outros países asiáticos, bem como nos países em desenvolvimento. Supõe-se que isso se deva ao envelhecimento das populações, à adoção de estilos de vida sedentários e à aceitação de dietas pouco saudáveis, como aquelas ricas em gordura animal e pobres em frutas, verduras e fibras. Assim, cerca de 500.000 óbitos

por ano são atribuídos à doença em todo o mundo, representando um problema de saúde pública importante (Rossi *et al.*, 2004).

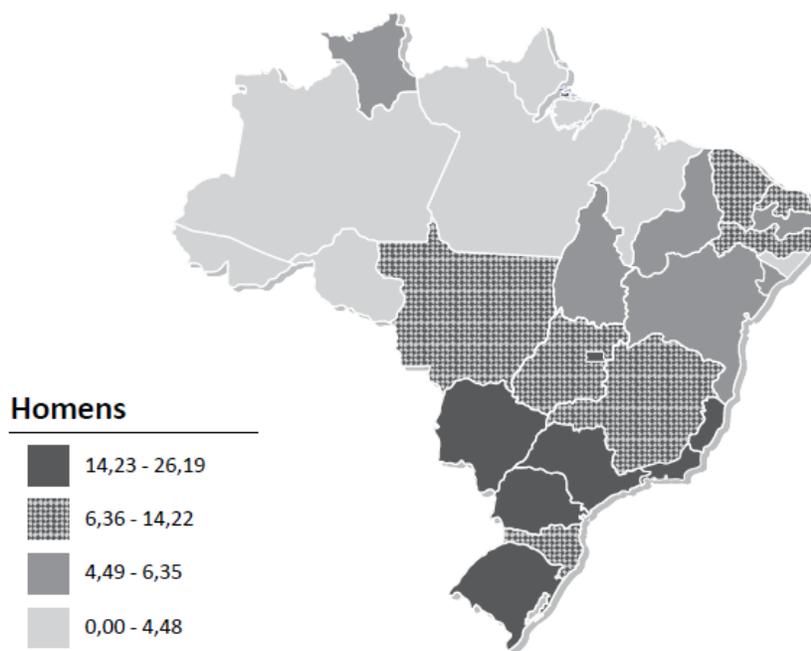


Figura 1: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil homens, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)
Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?!D=6>

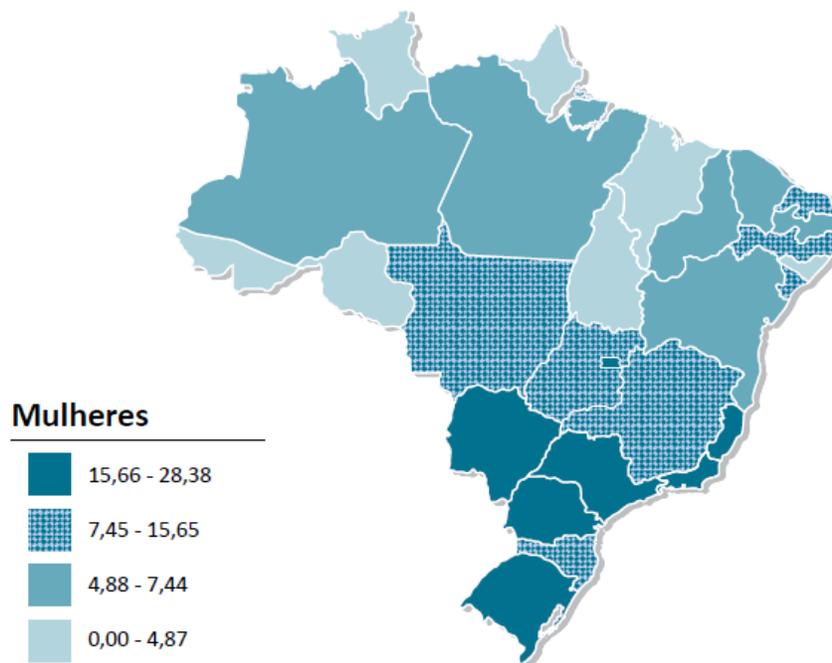


Figura 2: Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2012, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna do cólon e reto)
 Fonte: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/mapa.asp?ID=6>

A sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% para países em desenvolvimento. Assemelhando-se à incidência, as taxas de mortalidade são mais baixas em mulheres do que nos homens, exceto na região do Caribe (INCA, 2013).

O desenvolvimento de várias formas comuns de câncer é resultado da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável desses fatores a dieta. Uma dieta com base em um alto consumo de frutas, vegetais frescos, cereais e peixes, bem como a prática de atividade física, estão associados a um baixo risco de desenvolvimento do CCR. Por outro lado, o consumo excessivo de carne vermelha, embutidos, bebidas alcoólicas, o tabagismo e a obesidade ou o sobrepeso favorecem o desenvolvimento desse tipo de câncer. Mas os fatores de risco mais relevantes são a história familiar de CCR e a predisposição

genética ao desenvolvimento de doenças crônicas do intestino. A idade também é considerada um fator de risco, uma vez que tanto a incidência como a mortalidade aumentam com a idade (INCA, 2013).

A história natural dessa neoplasia propicia condições ideais à sua detecção precoce. A pesquisa de sangue oculto nas fezes e métodos endoscópicos são considerados meios de detecção precoce para esse câncer, pois são capazes de diagnosticar e remover pólipos adenomatosos colorretais (precursores do câncer do cólon e reto), bem como tumores em estágios bem iniciais. Mesmo em países com maiores recursos, a relação custo-benefício em investimentos para estratégias apropriadas de prevenção e detecção precoce do CCR, tem impossibilitado a implantação de rastreamento populacional. Essas estratégias não têm o objetivo de diagnosticar mais pólipos ou lesões planas, mas sim diminuir a incidência e a mortalidade por esse tipo de neoplasia (INCA, 2013).

1.2 Aspectos Clínicos

Os sintomas relativos ao CCR são extremamente variáveis, em decorrência de formas diferentes de crescimento e localização dos tumores (Figura 3). Os principais sintomas são o sangramento retal, alteração do hábito intestinal e dor abdominal (Wayer, 1980; Rossi *et al.*, 2004). A doença ocorre, em 90% dos casos, em indivíduos com idade maior ou igual a 50 anos (Peters *et al.*, 1989; Schottenfeld, 1995). Além disso, o risco para o desenvolvimento do CCR aumenta bruscamente a partir dos 50 anos, duplicando a cada década e atingindo o seu máximo entre 75 e 80 anos (Winawer *et al.*, 1985). Os cânceres de cólon e de reto predominam discretamente em indivíduos do sexo masculino em relação aos do sexo feminino (INCA, 2013). O principal sistema de estadiamento do tumor

utilizado para a determinação do prognóstico e da terapêutica adequada a ser administrada a cada paciente é o TNM (Greene *et al.*, 2002) (Quadros 1 e 2).

O sistema TNM considera a extensão do acometimento do tumor na parede do cólon ou reto e em tecidos e órgãos adjacentes (T), a identificação da presença ou ausência de metástases em linfonodos (N) e a identificação da presença ou ausência de metástases em órgãos distantes (M). Cinco grupos de pacientes podem ser identificados por este sistema (estágios 0, I, II, III e IV) (Greene *et al.*, 2002) , sendo que as maiores probabilidades de sobrevivência são observadas naqueles com os estágios 0 e I e a menor probabilidade de sobrevivência naqueles com o estágio IV da doença (Fielding, 1995) (Figura 4 e 5). Sobre os avanços terapêuticos, apenas cerca de 50% dos pacientes com CCR sobrevive por um período de cinco anos (Jemal *et al.*, 2007).



Figura 3: Cólon: anatomia geral e tumor invadindo

http://www.nitisurgical.com/colon_cancer_pictures.htm

Quadro 1: Sistema TNM

TNM		
Tumor Primário (T)	Linfonodos Regionais (N)	Metástases a Distância (M)
(TX) Tumor primário inacessível	(NX) Linfonodos regionais inacessíveis	(MX) Presença de metástases a distância não pode ser observada
(TO) Sem evidência do tumor primário		(M0) Sem metástases a distância
(Tis) Carcinoma in situ intraepitelial ou invasão da lâmina própria		
(T1) Tumor invadindo submucosa	(N1) Metástases em um até três linfonodos pericólicos ou perirretais	(M1) Metástases a distância
(T2) Tumor invadindo a muscular própria	(N2) Metástases em quatro ou mais linfonodos peri-cólicos ou perirretais	
(T3) Tumor invadindo através da muscular própria até subserosa ou nos tecidos pericólicos não peritonizados ou perirretais	(N3) Metástases em qualquer linfonodo ao longo da cadeia vascular principal e/ou metástase no linfonodo apical desta cadeia	
(T4) Tumor invadindo diretamente outros órgãos ou estruturas e/ou perfurando vísceras peritoneais		

Quadro 2: Estadiamento Clínico

Estadiamento					
Estagio	Tumor Primário	Linfonodos Regionais	Metástases a Distância	Dukes	Astler-Colle
Estadio 0	Tis	N0	M0		
Estadio I	T1	N0	M0	A	A
	T2	N0	M0	A	B1
Estadio II	T3	N0	M0	B	B2
	T4	N0	M0	B	B3
Estadio III	Qualquer T	N1	M0	C	C1
	Qualquer T	N2	M0	C	C2
	Qualquer T	N3	M0	C	C3
Estadio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1	C	D

Fonte: Cordeiro *et al.* Diagnóstico, Estadiamento e Tratamento Cirúrgico e Multidisciplinar do Câncer Colorretal. In: Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. Projeto Diretrizes. São Paulo, 2001.

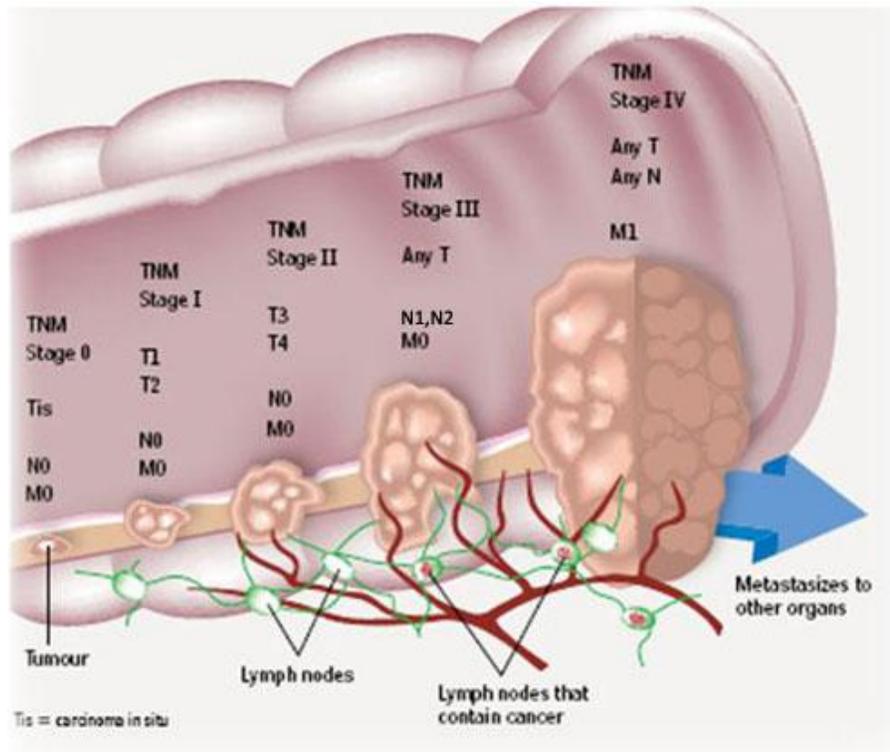


Figura 4: Sistema TNM descreve a extensão clínica do tumor

<http://www.colorectal-cancer.ca/en/just-the-facts/what-cancer/>

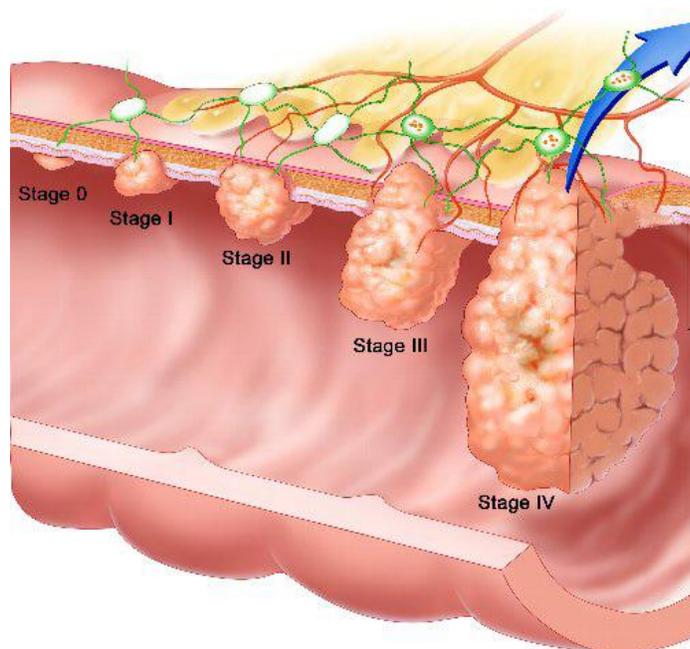


Figura 5: Estágios do tumor

<http://healthinessbox.wordpress.com/tag/colorectal-cancer/>

1.3 Patologia do CCR

O termo câncer engloba todas as neoplasias, ou tumores de caráter maligno, que apresentam capacidade de invadir tecidos adjacentes e espalhar-se para sítios distantes (metástases).

O cólon, incluindo o reto, é o sítio mais frequente de neoplasias primárias do que qualquer outro órgão em todo o corpo humano (Robbins *et al.*, 1998). No intestino grosso podem ocorrer tanto neoplasias de origem benigna, os adenomas, quanto de origem maligna, os carcinomas. Os adenocarcinomas constituem quase a totalidade dos cânceres colorretais e representam 70% de todas as neoplasias malignas do trato gastrointestinal.

Os adenomas pré-existentes constituem terreno fértil para a transformação maligna sob certas circunstâncias; contudo, na realidade, apenas uma pequena porcentagem destas lesões irá de fato dar origem aos carcinomas colorretais. Parece certo admitir que a herança, mas sobretudo a ação direta de agentes carcinogênicos sobre a mucosa colorretal, resulta em acúmulo de defeitos genéticos parcialmente identificados e que concorrem para a carcinogênese epitelial no intestino grosso (Cotti *et al.*, 2000).

Uma associação entre carcinoma e pólipos colorretais foi descrita, baseada em observações clínicas, epidemiológicas e anátomo-patológicas, sendo conhecida hoje como sequência “adenoma-carcinoma” (Hill *et al.* 1978). Apesar da falta de estudos prospectivos e bem controlados, parece ser verdade que a maioria dos carcinomas do cólon e reto (aproximadamente 95% destes) desenvolve-se a partir dos adenomas, onde algumas etapas tanto macroscópicas quanto microscópicas vêm sendo estabelecidas e, por sua vez, correlacionadas com alterações genéticas.

1.3.1 Sequência adenoma-carcinoma

A sequência adenoma-carcinoma foi descrita pela primeira vez por Hill e colaboradores, em 1978 (Figura 6 e 7). Os carcinomas colorretais raramente provêm da mucosa intestinal quando não pode ser identificada lesão adenomatosa associada. Assim, eles apresentam lesão precursora não maligna: o adenoma displásico. As primeiras alterações epiteliais na sequência adenoma-carcinoma, já descritas em humanos, foram denominadas criptas aberrantes. Estas consistem em algumas criptas que apresentam lúmen alargado e de forma anormal. A histologia é característica de alterações displásicas e, portanto, podem ser classificadas como microadenomas. Essas alterações consistem em expansão da zona proliferativa de células na cripta colônica, passando a incluir células localizadas ou próximas da superfície epitelial. Com a continuação do crescimento, o foco de criptas aberrantes e displásicas provavelmente origina a lesão polipóide visível. Com o decorrer do tempo, as células do adenoma vão sofrendo alterações, tornando-se menos diferenciadas e mais displásicas. Finalmente, elas adquirem o fenótipo de um carcinoma com a capacidade de ultrapassar a barreira da lâmina própria e atingir a mucosa. Em seguida, novas alterações genéticas permitem-nas, após se distribuir pela mucosa e envolver a parede colônica, adquirir a capacidade de invadir linfonodos locais ou órgãos distantes. Modelos animais de tumorigênese no cólon e estudos clínicos observacionais embasaram a sequência adenoma-carcinoma. As evidências principais são as seguintes: - populações que apresentam prevalência alta de adenomas apresentam prevalência alta de CCR e vice-versa; a distribuição do adenoma no cólon e reto é similar à do CCR; a ocorrência de pólipos adenomatosos antecede por cerca de 10 a 15 anos o CCR; quando um CCR invasivo é diagnosticado precocemente, tecido adenomatoso ao redor é frequentemente identificado; o risco de câncer encontra-se diretamente relacionado ao

número de adenomas e, por isso, a probabilidade de CCR em pacientes com síndromes de polipose adenomatosa familiar (PAF) é de quase 100%; programas de polipectomias colonoscópicas reduzem a incidência de CCR nos pacientes, funcionando como medida de prevenção secundária ao CCR (Cotti *et al.*, 2000).

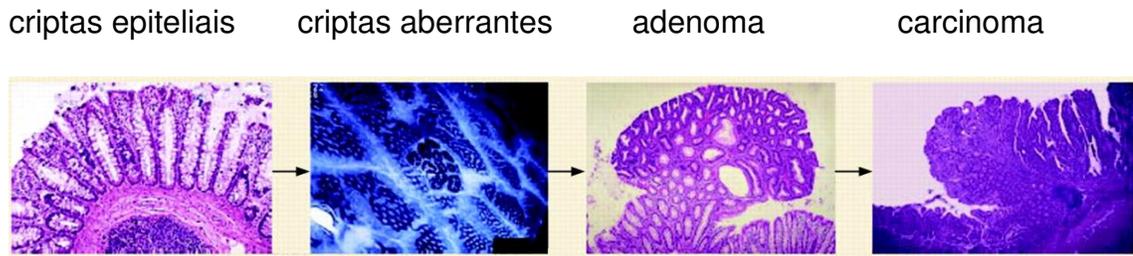


Figura 6: Evolução anatômica da sequência adenoma- carcinoma

<http://jcp.bmjournals.com/content/61/2/164/F2.large.jpg>

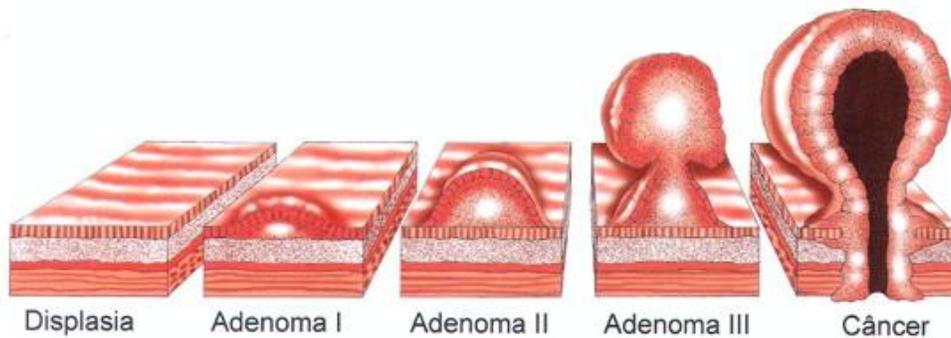


Figura 7: Estrutura da sequência adenoma-carcinoma

<http://www.endoclinic.med.br/exames/colonoscopia/cancer/index.php?pagina=6>

As neoplasias do cólon, incluindo adenomas e carcinomas, são monoclonais por natureza, ou seja, provêm de uma única célula. Assim, uma célula no epitélio normal sofre uma ou mais modificações que conferem uma vantagem de crescimento seletiva em relação às células epiteliais ao redor. A progressão de um microadenoma para um adenoma, e deste

para um carcinoma, resulta de uma série de modificações genéticas que se acumulam em uma população clonal, gerando células com crescimento ou características de sobrevivência aumentadas em cada mutação nova gerada. Este processo de carcinogênese com múltiplos passos no desenvolvimento do CCR sugere que vários eventos genéticos sejam necessários antes que uma célula verdadeiramente maligna seja gerada. A possibilidade de identificar alteração genética associada a lesões pré-malignas de CCR, tais como um adenoma viloso com displasia acentuada ou lesões de criptas aberrantes, representam a base metodológica e o objetivo do rastreamento genético do CCR (Cotti *et al.*, 2000).

1.4 Aspectos ambientais

O desenvolvimento do CCR é resultado de uma interação complexa de variáveis, incluindo elementos externos, como a exposição a agentes ambientais e dietéticos, e fatores internos, de natureza somática ou hereditária (Rossi *et al.*, 2004). Alguns fatores ambientais parecem agir como carcinógenos diretamente ou aumentar as frequências de mutações somáticas, predispondo ou determinando o aparecimento da neoplasia (Harden, 1995; Schottenfeld, 1995). Existe uma associação óbvia entre o padrão da dieta e o CCR, ainda que não tenha sido identificado um carcinógeno específico que justifique completamente esta relação (Shike, 1995). Dietas ricas em carne vermelha e gordura saturada e carentes em frutas, vegetais e grãos, que contêm fibras insolúveis, ácido fólico, micronutrientes antioxidantes e cálcio, estão, em geral, associadas ao aumento do risco de ocorrência da doença (Satia-Abouta *et al.*, 2004; English *et al.*, 2004; Sanz *et al.*, 2004; Turner *et al.*, 2004). As fibras podem funcionar como constituintes anticarcinogênicos por meio de vários mecanismos. Um deles é o aumento do volume das fezes, que estimula o peristaltismo e

diminui o tempo de exposição do epitélio colorretal a carcinógenos intraluminais; outro seria pela estabilização dos níveis séricos de insulina que retardam a absorção do amido, cuja fermentação aumenta a produção de ácidos graxos de cadeia curta, os quais têm ação anticarcinogênica (Rossi *et al.*, 2004).

Por outro lado, o folato é importante na síntese, reparo e metilação do ácido desoxirribonucléico (DNA). A deficiência de folato pode causar a troca de incorporação de uracil por timidina durante a síntese do DNA, o que pode levar ao aumento das mutações espontâneas; aumento da sensibilidade a agentes causadores de danos ao DNA e frequência aumentada das aberrações cromossômicas e de erros de replicação do DNA. Também, anormalidades na metilação de DNA podem determinar a ação de oncogenes ou inibir genes supressores de tumor (Giovannucci, 2002; Rossi *et al.*, 2004). É possível que alguns alimentos constituam uma fonte de substratos que possam ser metabolizados, por bactérias do cólon, as substâncias carcinogênicas ou mutagênicas, (Hill, 1995) ou ainda, que possam ser ativados, por enzimas presentes na mucosa cólica (De Waziers *et al.*, 1991). Dentre estes substratos estão as aminas aromáticas (AA), incluindo as arilaminas e as aminas heterocíclicas, produzidas pela exposição de carnes a temperaturas de pirólise durante o cozimento, e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HAP), contidos nos óleos vegetais (Sachse *et al.*, 2002). Outro fator importante responsável pela exposição ambiental aos HAP e às AA é o cigarro (Sachse *et al.*, 2002), que parece estar associado ao aumento do risco do CCR após um período de indução relativamente longo (Knekt *et al.*, 1998) ou de número considerável de cigarros consumidos por dia (Slattery *et al.*, 1998). As AA e HAP podem causar danos ao DNA de células do cólon humano (Alexandrov *et al.*, 1996) e, desta forma, determinar o CCR. Outro aspecto também importante, mas ainda de forma não muito bem elucidada, é a ação do álcool na carcinogênese. O etanol, ou um metabólito

deste, o acetaldeído, pode induzir a hipometilação do DNA, uma das primeiras etapas na carcinogênese do CCR, através do efeito anti-folato (Hillman *et al.*, 1982). Além disso, o acetaldeído metabolizado pelas bactérias da flora intestinal pode aumentar o risco de CCR por causar deficiência de folato (Mizoue *et al.*, 2006).

1.5 Aspectos Genéticos

O câncer é uma doença genética, na qual ocorrem alterações em genes. Muitos mecanismos podem ser prejudicados devido a essas mutações, que podem ser hereditárias ou adquiridas (Ferreira e Rocha, 2004; Rossi *et al.*, 2004).

Mutações em oncogenes ou genes supressores tumorais (Guillem *et al.*, 1995) podem levar à instabilidade de microsátélites (Guillem *et al.*, 1995) e à desregulação de sinais das vias de transdução (Guillem *et al.*, 1995), que parecem estar definitivamente associadas à doença. Embora a maioria dos casos de CCR seja esporádica, é bem conhecido que indivíduos de determinadas famílias apresentam risco aumentado da doença (Houlston e Peto, 1996). De fato, mutações de alta penetrância, particularmente as mutações nos genes APC, *MLH1* e *MSH2*, foram descritas em pacientes com CCR hereditário (Rossi *et al.*, 2004).

1.5.1 CCR Hereditário

As síndromes hereditárias são responsáveis por cerca de 6% dos casos de CCR (Fearnhead *et al.*, 2002). As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são: a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), responsável por menos

de 1% dos casos, e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC) ou Síndrome de Lynch (SL; MIM #120435), responsável por cerca de 5% dos casos (Lynch *et al.*, 2005). Como a predisposição ocorre para tumores de diferentes sítios primários, e não somente para CCR, a denominação SL é menos restritiva (Boland, 2005; Vasen e Boland, 2005). Os critérios diagnósticos para a SL são controversos, devido a variações fenotípicas (Wang *et al.*, 2007). O diagnóstico clínico tem como base os antecedentes familiares de câncer, de acordo com os critérios de Amsterdã, e a suspeita clínica, de acordo com os critérios de Bethesda (Vasen, 2005). Em 1991, o Grupo Colaborativo Internacional em HNPCC (ICG/HNPCC) publicou os Critérios de Amsterdã (Quadro 3), com a intenção de promover uma padronização internacional no diagnóstico clínico da SL (Vasen *et al.*, 1991).

Quadro 3: Critérios de Amsterdã para o diagnóstico clínico de SL

• Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR
• Um dos membros ser parente em 1º grau dos outros dois
• Pelo menos duas gerações acometidas
• Pelo menos um dos membros com CCR e idade inferior a 50 anos
• Exclusão de polipose adenomatosa familiar (PAF)

Os critérios de Amsterdã tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico, porém foram criticados por serem muito restritivos e não considerarem os tumores extracolônicos. Por isso, foram propostas algumas recomendações, conhecidas como critérios de Bethesda (Quadro 4), que são consideradas mais sensíveis e menos restritivas que os critérios de Amsterdã, para identificar indivíduos candidatos a testes de rastreamento (Boland *et al.*, 1998).

Quadro 4: Critérios de Bethesda para o diagnóstico clínico de SL

• Indivíduos que preenchem os Critérios de Amsterdã
• Indivíduos com dois tumores relacionados à SL, incluindo CCR sincrônico ou metacrônico, ou tumores extracolônicos
• Indivíduos com CCR, e um parente em 1º grau com CCR, e/ou tumor extracolônico relacionado à síndrome, e/ou adenoma colorretal, um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos
• Indivíduos com CCR, ou câncer endometrial, diagnosticado antes de 45 anos
• Indivíduos com câncer no cólon direito, com padrão histológico indiferenciado (sólido/cribriforme), antes dos 45 anos
• Indivíduos com CCR, com células em anel de sinete, diagnosticado antes dos 45 anos
• Indivíduos com adenomas, diagnosticados antes dos 40 anos

Em 1999, o mesmo grupo modificou os critérios de Amsterdã, denominados Amsterdã II, que passaram a incluir alguns tumores extracolônicos, com o objetivo de torná-los menos restritivos (Quadro 5) (Vasen *et al.*, 1999).

Quadro 5: Critérios de Amsterdã II para o diagnóstico clínico de SL

• Pelo menos três membros de uma mesma família com CCR, ou adenocarcinoma de endométrio, ou carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais, (pelve renal ou ureter), ou adenocarcinoma de intestino delgado
• Um dos membros ser parente em 1º grau dos outros dois
• Pelo menos duas gerações acometidas
• Pelo menos um dos membros com CCR e idade menor que 50 anos
• Exclusão de polipose adenomatosa familiar (PAF)

Apesar das modificações nos critérios de Amsterdã, ainda havia dificuldade no diagnóstico clínico em famílias pequenas. Em 2004, os critérios de Bethesda foram revisados, aumentando ainda mais sua sensibilidade (Quadro 6) (Umar *et al.*, 2004).

Quadro 6: Critérios de Bethesda revisados, visando à identificação de indivíduos candidatos aos testes de rastreamento para a SL

• CCR diagnosticado em paciente com menos de 50 anos
• Presença de CCR sincrônico ou metacrônico, ou outro tumor extracolônico, associado à síndrome, independentemente da idade
• CCR com histologia sugerindo MSI*, diagnosticado em paciente com menos de 60 anos
• CCR diagnosticado em um ou mais parentes em 1º grau, com tumor relacionado à síndrome, com um dos tumores tendo sido diagnosticado antes dos 50 anos
• CCR diagnosticado em um ou mais parentes de 1º ou 2º graus, com tumores relacionados à síndrome, independentemente da idade

*Presença de linfócitos infiltrando o tumor, reação linfocítica Crohn-like, diferenciação mucinosa ou em anel de sinete ou padrão de crescimento medular.

Na década de 1980, diferentes sítios primários foram descritos em famílias com suposto diagnóstico de SL: endométrio, ovário, sistema nervoso central (SNC), trato hepato-biliar, intestino delgado, trato urológico, mama (Lynch *et al.*, 1988), estômago (Cristofaro *et al.*, 1987), pâncreas e sistema linfático e hematopoiético (Love, 1985). Diversas publicações sobre o assunto foram feitas, nas quais os cânceres mais comuns descritos como associados à SL eram: endométrio, estômago e trato urinário (Vasen *et al.*, 1990).

A SL é uma doença de herança autossômica dominante, com penetrância da ordem de 80% (Lynch e Smyrk, 1996) e os pacientes não apresentam os múltiplos pólipos adenomatosos vistos na FAP, o que dificulta a identificação clínica dos portadores da doença. Quando comparamos CCR na SL com CCR esporádico, notamos predileção para: acometimento do cólon direito (68% vs. 49%); maior incidência de CCR sincrônico (7% vs. 1%); maior incidência de CCR metacrônico em 10 anos (29% vs. 5%); e manifestação mais precoce da doença, geralmente, entre 40 e 45 anos de idade (Fitzgibbons *et al.*, 1987).

O aparecimento de tumores extracolônicos em outros membros da mesma família também pode indicar a presença da doença. Alguns estudos demonstram que, na SL, a evolução do adenoma para o adenocarcinoma ocorre mais rapidamente em relação às lesões esporádicas (Jarvinen *et al.*, 1995). Os portadores da SL possuem risco aumentado de desenvolver CCR (60% a 70% aos 70 anos), carcinoma endometrial (30% a 40% aos 70 anos) e, com menores riscos, carcinomas de intestino delgado, de células transicionais do trato urinário, câncer de ovário, câncer de estômago, tumores cerebrais (Síndrome de Turcot) e tumores de glândulas sebáceas (Síndrome de Muir-Torre) (Hendriks *et al.*, 2006). O risco cumulativo de ocorrência de diferentes tumores relacionados à SL é apresentado em alguns estudos: 78% para CCR; 40% a 60% para endométrio; 19% para gástrico; 17,5% para trato biliar; 10% para trato urinário; e 10% a 12% para ovário. O risco de qualquer tumor metacrônico pode chegar a 90% após o tratamento do CCR, e 75% após o tratamento de câncer de endométrio (Aarnio *et al.*, 1999; Dunlop *et al.*, 1997).

Os genes *MSH2* e *MLH1* respondem, aproximadamente, por 85% a 90% das mutações conhecidas, associadas à SL (Goecke *et al.*, 2006; Peltomaki, 2005). Os genes *PMS1*, *PMS2* e *MSH6* são responsáveis pelo restante das alterações (Drummond *et al.*, 1995; Palombo *et al.*, 1995). Cerca de 90% dos indivíduos portadores de HNPCC ou SL apresentam instabilidade de microssatélites (MSI) no tecido tumoral (De la Chapelle, 2005). A classificação de MSI é feita de acordo com a frequência de alterações de marcadores selecionados: estáveis - nenhum marcador alterado (MSS); alta instabilidade - mais de 30% alterados (MSI-H); baixa instabilidade - menos de 30% alterados (MSI-L) (Boland *et al.*, 1998).

1.5.1.1 Genes de reparo do DNA (Mismatch Repair- MMR)

No HNPCC, a alteração genética herdada é a inativação de um dos alelos dos genes envolvidos no reparo do DNA (genes *hMSH2* e *hMLH1*, principalmente). A inativação do segundo alelo faz com que a célula perca sua capacidade de realizar reparos no DNA, o que abre caminho para o surgimento de diversas mutações somáticas que acabam por levar ao surgimento do HNPCC (Cotti *et al.*, 2000).

Mutações somáticas podem surgir na célula de diversas maneiras, causadas por substâncias mutagênicas tanto endógenas como exógenas. Outra possível fonte de mutações somáticas são os erros cometidos pela DNA polimerase durante a replicação do DNA. Estima-se que esses erros ocorram a cada 10^5 bases, sendo que 99% são corrigidos pela própria enzima, deixando então um erro a cada 10^7 bases (Cotti *et al.*, 2000). É ativado então o sistema de *Mismatch Repair* (MMR) do DNA da célula, cuja principal função é o reconhecimento e correção de três tipos de erros: pareamento desigual de bases simples, bases quimicamente alteradas e alças na hélice. No primeiro tipo de erro, a DNA polimerase falha em parear um nucleotídeo na fita-padrão de DNA com o seu complemento correto na fita nova que está sendo sintetizada. No segundo tipo de erro, a polimerase incorpora bases modificadas quimicamente por mutágenos na fita nova que está sendo sintetizada. O terceiro tipo de erro ocorre quando a polimerase se vê face a uma sequência muito repetitiva de DNA, como muitos nucleotídeos A (polyA) ou muitos dinucleotídeos GA. Se a sequência da fita-padrão é altamente variada, a sequência da fita-nova só pode ser de um único jeito. Porém, se a fita padrão tem uma sequência muito repetitiva, a DNA polimerase pode errar e permitir a inclusão de um ou dois nucleotídeos extras. Se o sistema MMR falhar, começam a ocorrer mutações com frequência muito maior (Barnes *et al.*,

1993; Friedberg *et al.* 1995; Hojmakers 1993 a, b; Kolodner, 1995; Kornberg e Baker, 1992; Sancar e Sancar, 1988).

Muito antes de ser descoberto nos seres humanos, o sistema MMR já era estudado em organismos mais simples. Na bactéria *Escherichia coli* três proteínas constituíam o cerne do sistema: as proteínas codificadas pelos genes *mutS*, *mutL* e *mutH30*. Também se encontraram genes homólogos aos das bactérias em leveduras, os genes *yMSH2*, *yMLH1* e *yPMS1* (Reenan e Kolodner, 1992 a,b). Notou-se que mutações nos genes MMR tanto das bactérias como dos fungos levavam a um fenótipo de desestabilização. Os microssatélites são regiões do genoma que consistem de repetições de um a quatro nucleotídeos. São altamente polimórficas quanto ao seu comprimento, de modo que uma mesma pessoa tem em geral dois alelos diferentes para cada microssatélite. No entanto, as sequências que flanqueiam os microssatélites são extremamente estáveis. Isso permitiu a análise do comprimento dos microssatélites pela técnica de PCR (Polymerase Chain Reaction - Reação em Cadeia de Polimerase) (Hojmakers 1993 a, b; Sancar e Sancar, 1988). Ao mesmo tempo que se analisavam mutações do sistema MMR em bactérias, percebeu-se que ocorriam fenômenos semelhantes com as sequências microssatélites em tumores humanos. Foi dado a este fenótipo o nome de Instabilidade de Microssatélites (MSI) ou fenótipo RER+ (Replication Error Positive) e constatado que estava associado ao HNPCC. Foi o primeiro passo na caracterização das alterações genéticas que levam ao HNPCC (Ionov *et al.*, 1993; Kolodner, 1995; Lynch *et al.* 1996; Marra e Boland, 1996; Peinado *et al.*, 1992; Perucho *et al.*, 1994).

Iniciaram-se então os estudos para identificar os genes homólogos do sistema MMR no ser humano (Wevrick e Buchwald, 1993). O primeiro a ser identificado e clonado foi o *hMSH2*, localizado no cromossomo 2p, homólogo da *mutS* (Fishel *et al.*, 1993; Leach *et*

al., 1993). Seguiu-se a identificação do gene *hMLH1*, no cromossomo 3p21, homólogo da mut L (Lindblom *et al.*, 1993; Papadopoulos *et al.*, 1994), e dos genes *hPMS1* e *hPMS2*, nos loci 2q31-33 e 7p22 (Nicolaidis *et al.*, 1994). Em 1995 foi identificado o gene *hMSH6*, também conhecido como *hGTBP*, outro homólogo da mutS (Drummond *et al.*, 1995; Palombo *et al.*, 1995). Estudos têm demonstrado a interação e função dos produtos protéicos dos genes MMR. Sabe-se que a proteína *hMSH2* aparentemente tem a função chefe no serviço de reconhecimento de erros de pareamento de bases. Ela age, porém, formando um dímero com a proteína *hMSH6*, para formar o complexo *hMSH2/hMSH6*, homólogo do complexo mutS-alpha encontrado na *E. coli*. A *hMLH1* também forma um dímero, se juntando à *hPMS2*, e este complexo vai agora interagir com o complexo formado pela *hMSH2/hMSH6*. A função do *hPMS1* ainda não foi devidamente elucidada.

Os genes MMR seguem o padrão de gene supressor tumoral na definição de sua capacidade carcinogênica no HNPCC, requerendo a segunda mutação somática após a mutação germinativa para que haja perda efetiva de função e ocorra a carcinogênese. Em algumas linhagens celulares, porém, segue-se o padrão dominante negativo, em que a presença de apenas uma mutação confere o fenótipo maligno à célula. Acredita-se que nestes casos a proteína mutada interaja com a proteína selvagem impedindo sua ação adequada (Cotti *et al.*, 2000).

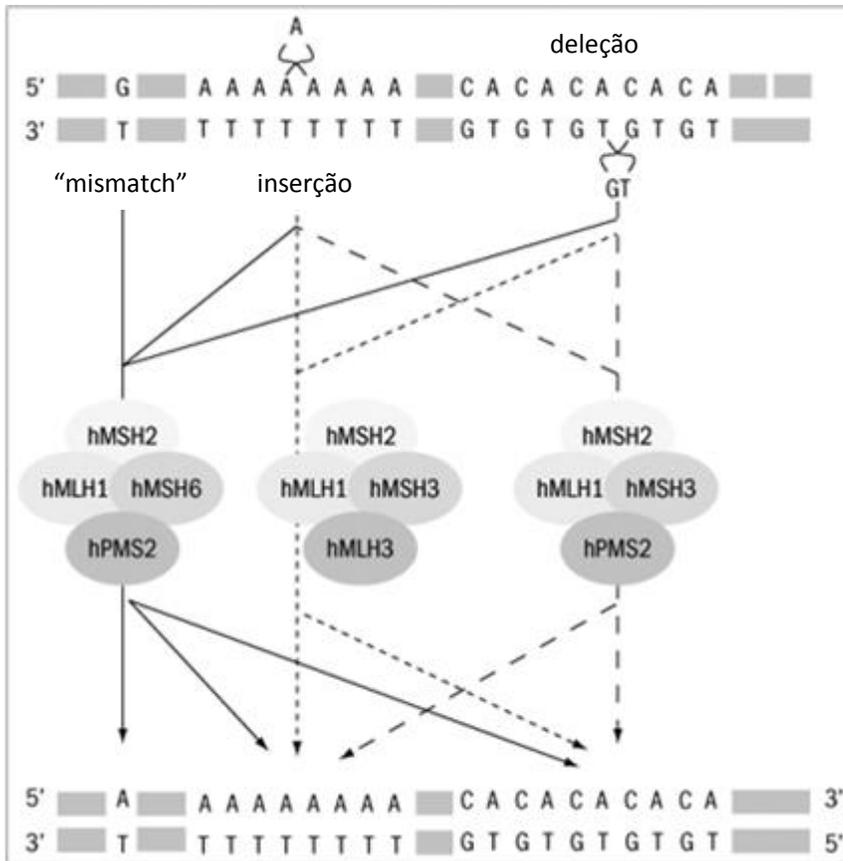


Figura 8: Modelo do Sistema de Reparo de “Mismatch”. No topo da figura temos uma fita dupla de DNA onde são exemplificados três alterações que são reparadas pelo Sistema “Mismatch”: um mau-pareamento base-base, uma inserção de um nucleotídeo e uma deleção de dois nucleotídeos. As três alterações são corrigidas pelo complexo protéico *MSH2/MSH6 – MLH1/PMS2*. Na falta de *MSH6*, a correção de deleção e inserção pode ser feita pelo complexo *MSH2/MSH3-MLH1/MLH3*. Já o complexo *MSH2/MSH3-MLH1/MLH3* parece, a partir de estudos em levedura, direcionar a correção de alguns tipos de inserção/deleção (Silva *et al.*, 2009).

1.5.2 Genes

1.5.2.1 hMLH1

O gene *MLH1* foi mapeado no cromossomo 3p21.3 por Papadopoulos *et al.* (1994) e possui 19 éxons (Han *et al.*, 1995). Há um grande número de mutações descritas (Gráfico 1), sendo que algumas foram encontradas em maior prevalência, que seriam: *MLH1**del éxon 16 e *MLH1**IVS5-1G>A na Finlândia (Moisio *et al.*, 1996; Nystrom-Lahti *et al.*, 1995), *MLH1**2141G>A em uma região da Suíça (Salvaara *et al.*, 2000; Hutter *et al.*, 1996) e *MLH1**415G>C em judeus asquenazitas (Lipkin *et al.*, 2004).

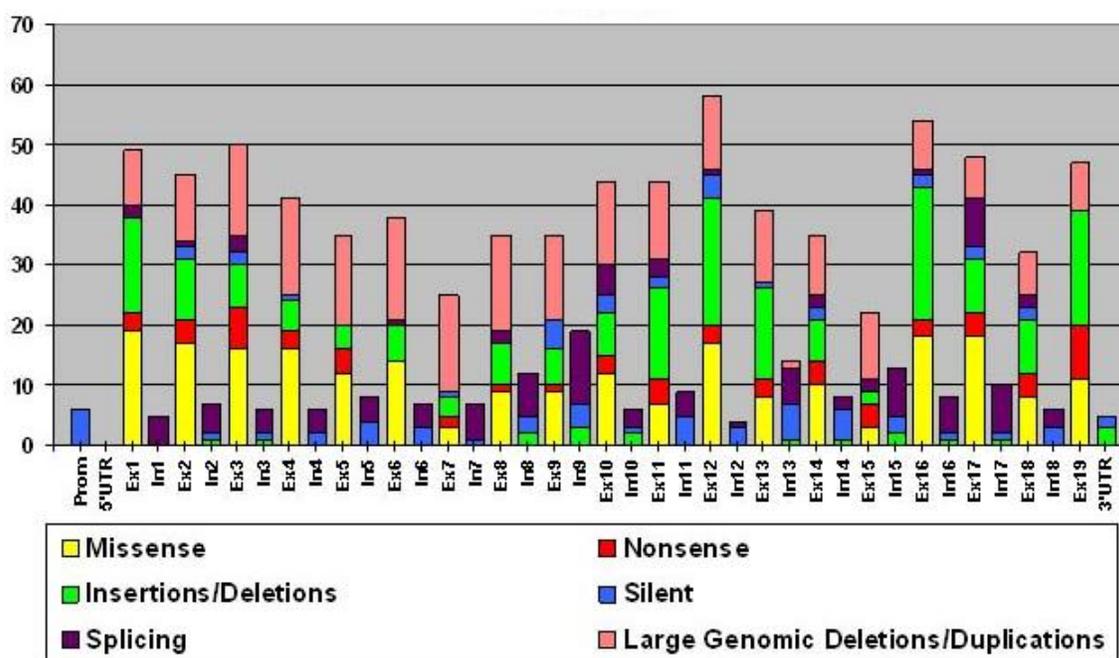


Gráfico 1: Distribuição das mutações no gene *MLH1* por éxons acometidos e por tipo de mutação, reportados da literatura.

<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/statistics.aspx>

1.5.2.2 hMSH2

O gene *MSH2* foi mapeado no cromossomo 2p22-p21 por Fishel *et al.* (1993) possui 16 éxons (Kolodner *et al.*, 1994). Há um grande número de mutações descritas (Gráfico 2), sendo que algumas foram encontradas em maior prevalência, que seriam:

*MSH2**IVS5+3A>T na província canadense de Newfoundland (Spirio *et al.*, 1999), *MSH2**1452-1455delAATG no sul da China (Chan *et al.*, 2004) e deleção de 16 kb em *MSH2* nos Estados Unidos (Lynch *et al.*, 2004).

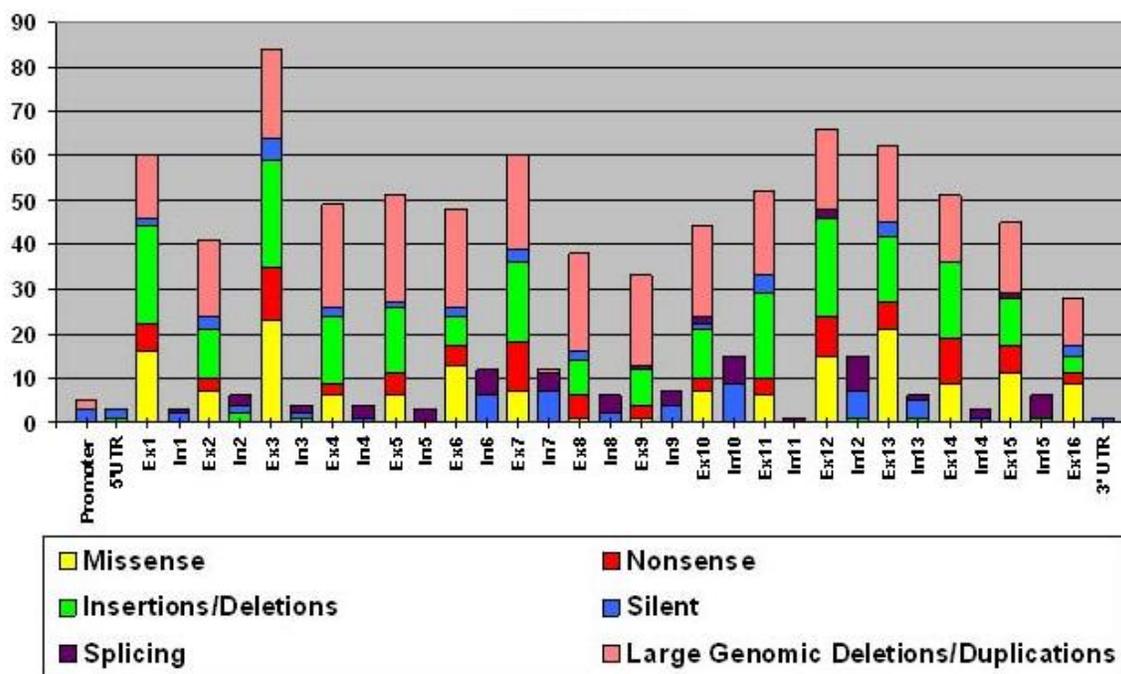


Gráfico 2: Distribuição das mutações no gene *MSH2* por éxons acometidos e por tipo de mutação, reportados da literatura.

<http://www.med.mun.ca/mmrvariants/statistics.aspx>

1.6 Tratamento e Seguimento da SL

A SL é a síndrome hereditária mais comum na espécie humana, com incidência entre 1:2.000 e 1:660 indivíduos. É fundamental que os pacientes sob risco, assim como suas famílias, realizem programas de rastreamento e protocolos de manejo (De La Chapelle, 2005).

O tratamento e o seguimento de pacientes portadores de CCR e SL são diferentes em relação aos pacientes com CCR esporádico (Muller *et al.*, 2001; Vasen, 2005). Para pacientes com câncer de cólon e SL, deve ser considerada, por exemplo, na escolha da conduta terapêutica, a colectomia total, com reconstrução por meio de anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Em casos de tumores retais, a proctocolectomia deve ser considerada. Tal conduta pode ser indicada em razão da alta probabilidade do indivíduo desenvolver novo tumor no cólon. Nos casos de câncer extracolônico, as cirurgias devem seguir o padrão oncológico clássico para o órgão afetado.

Os familiares sob risco, portadores assintomáticos da predisposição genética, também devem ser identificados, pois podem beneficiar-se de um seguimento intensivo, com o objetivo de diagnóstico de lesões precoces (Lynch, 2007). A indicação de tratamento na SL é mais complexa que na FAP, pois não são encontradas as centenas de pólipos adenomatosos benignos que se desenvolvem durante anos antes da transformação maligna, o que permite um melhor planejamento cirúrgico. O aparecimento de CCR em pacientes portadores de SL pode advir de pólipos adenomatosos isolados ou de carcinomas *de novo*, isto é, sem a presença de pólipo que anteceda à transformação para carcinoma (Rossi e Pinho, 1999).

Na orientação de membros assintomáticos de famílias de SL são considerados três grupos: 1) aqueles sabidamente portadores da predisposição genética; 2) aqueles sabidamente não portadores da predisposição genética; e 3) aqueles sem informações com relação ao teste. No grupo de indivíduos sabidamente portadores da predisposição genética e sem diagnóstico de CCR, há controvérsia sobre a realização de colectomia total profilática, com anastomose ileorretal. Conforme foi visto, a penetrância do gene é próxima de 80% e, portanto, 20% dos pacientes seriam operados desnecessariamente. Além disso, há questões referentes à morbimortalidade do tratamento cirúrgico e à chance de aparecimento de tumores em outros órgãos-alvo, ou no reto remanescente (Rodriguez-Bigas *et al.*, 1997). A conduta mais aceita é o seguimento rigoroso com colonoscopias realizadas com intervalos de um ano, a partir de 25 anos de idade. A histerectomia profilática, com ooforectomia, é uma opção para mulheres com prole constituída, de acordo com recente evidência de eficácia (Case *et al.*, 2008).

É importante lembrar que, para realizar o teste genético de predisposição em indivíduos de uma família portadora de SL, é necessário que a mutação tenha sido detectada em um membro da família que tenha desenvolvido CCR (probando). Endoscopia digestiva alta, exames de urina tipo I e citologia urinária, dosagem de CA125 e ultrassonografia abdominal devem ser considerados no rastreamento de lesões extracolônicas. Nas mulheres deve ser considerada, também, a ultrassonografia transvaginal para estudo do endométrio (Lynch e Smyrk, 1996; Rossi *et al.*, 1998). Nos indivíduos sabidamente não portadores de predisposição herdada, não há controvérsia, pois, nesse grupo, o risco de desenvolver CCR é igual ao da população em geral. O grupo de pacientes sem o resultado do teste deve ser considerado sob risco. Estabelecer uma rotina de atendimento de pacientes portadores de CCR com predisposição hereditária, juntamente

com suas famílias, é fundamental. Esse atendimento deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar, com as informações organizadas em um registro de famílias (banco de dados), e deve incluir aconselhamento, testes genéticos de predisposição para os que desejarem, rastreamento, tratamento e seguimento (Rossi *et al.*, 1997).

2. *OBJETIVOS*

Investigar nos indivíduos com diagnóstico clínico de HNPCC, a presença de mutações nos genes *MLH1* e *MSH2*.

Correlacionar as variáveis clínicas com o gene mutado.

Investigar familiares de portadores de HNPCC aos quais tivemos acesso, com relação a existência de mutações germinativas.

3. MÉTODOS

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Genética Molecular da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) na Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) em parceria com os Ambulatórios de Proctologia e Oncogenética do Hospital de Clínicas da Unicamp.

3.1. Casuística

Foram analisados 65 indivíduos divididos em três grupos, sendo (I) 46 pacientes portadores de câncer de colorretal inclusos nos Critérios de Amsterdã, (II) dois familiares portadores de câncer de colorretal e (III) 17 familiares sem câncer, todos da região metropolitana de Campinas, atendidos no Hospital de Clínicas da Unicamp.

O protocolo de pesquisa foi aprovado e homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2.007 (CEP 866/2007) (Anexo 1).

Um termo de consentimento livre e esclarecido foi assinado pelos participantes (Anexo 2) e um questionário foi aplicado para obter informações detalhadas sobre a história clínica e familiar dos pacientes (Anexo 3).

A etnia dos pacientes foi determinada por meio de entrevista, seguindo os critérios do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), mas por causa da dificuldade de classificação e pelo fato da população analisada ser altamente miscigenada, decidiu-se agrupá-los em brancos e não-brancos.

Todos os dados, foram confirmados nos prontuários dos pacientes. O fluxograma das fases da pesquisa com os pacientes analisados em cada fase, encontra-se na figura 9.

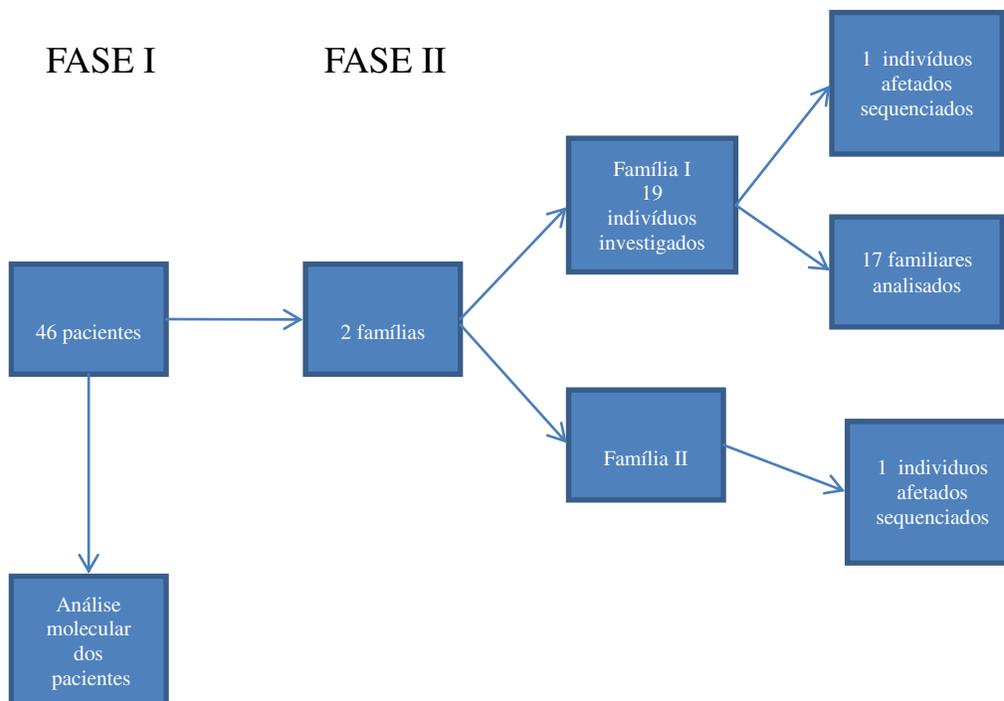


Figura 9: Fluxograma da casuística analisada. Fase I- Sequenciamento dos genes *MLH1* e *MSH2* em pacientes portadores de HNPCC. Fase II- Análise molecular do DNA das famílias de dois pacientes investigados na Fase I.

3.2. Métodos

3.2.1. Extração de DNA

Procedemos à extração de DNA de leucócitos do sangue periférico conforme o método descrito por Woodhead et al. (1986), com algumas modificações.

Dois tubos de coleta a vácuo com EDTA com cerca de 5 mL de sangue periférico foram coletados, contendo, cada um deles EDTA 15% para impedir a coagulação sanguínea. A amostra foi centrifugada por 10 minutos a 2.000 r.p.m. à temperatura ambiente para a separação e retirada do plasma. Em seguida, uma alíquota de 500 µL do sedimento foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL. A essa alíquota foi adicionado 1,0 mL de tampão de lise celular (Sacarose 320mM, Tris - HCl pH7,5 10mM, MgCl₂

5mM, Triton 100X). A solução foi então homogeneizada por 10 a 15 segundos e levada à centrífuga a 8000 r.p.m. por 5 minutos. Após a centrifugação o sobrenadante foi descartado, por inversão do tubo. Esse processo foi repetido por duas vezes. Ao precipitado formado foram adicionados 395µL de tampão de digestão (Tris - HCl pH 7,5 EDTA 10mM, 10mM, NaCl 10mM, SDS 0,5%) e 5 µL de proteinase K (20mg/mL). A reação então foi homogeneizada e incubada em banho-maria à temperatura de 55°C. Após 2 horas, foram adicionados 200µL de LiCl 7,5M em cada amostra e as soluções foram levadas à temperatura de - 20°C por 15 minutos. Após esta etapa, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 r.p.m. e o sobrenadante foi transferido cuidadosamente para novos tubos. Após a transferência, foi adicionado 1 mL de etanol absoluto gelado e o tubo foi invertido até formação de um precipitado visível. Foi realizada uma centrifugação a 13000 r.p.m. por 5 minutos e o sobrenadante foi desprezado por inversão do tubo. Ao precipitado foi adicionado 1 mL de etanol 70% e nova centrifugação foi realizada (13000 r.p.m./5 min). O sobrenadante foi novamente descartado. O DNA obtido foi deixado à temperatura ambiente para a evaporação do etanol residual e ressuspenso em água estéril. A eficiência da extração foi avaliada em gel de agarose a 0,8%.

3.2.2. PCR

A técnica de reação em cadeia da polimerase (denominada de PCR, abreviatura do nome em inglês, “polymerase chain reaction”) descrita por Saiki *et al.*, (1971), possibilita a amplificação de uma pequena sequência de DNA através do uso de dois iniciadores (“primer”) que flanqueiam a região do DNA a ser amplificada, onde se hibridizam devido a complementariedade de bases de suas sequências. A amostra de DNA foi misturada em uma solução com os iniciadores e, logo em seguida, foram realizados, em um aparelho

ciclador de temperatura, repetidos ciclos de desnaturação térmica do DNA, anelamento dos iniciadores em temperaturas adequadas e a extensão dos iniciadores promovida pela enzima Taq DNA polimerase, levando ao acúmulo exponencial da sequência de DNA alvo.

As sequências alvo foram amplificadas por PCR utilizando os iniciadores (BIONNER) que foram sintetizados pelo programa *Primer 3*® e estão nas tabelas 1 e 2.

O volume final da reação foi de 50 μ L e foi composto pelos seguintes reagentes:

- 1 μ L do iniciador F (20 pmoles) (Tabela 1 e 2);
- 1 μ L do iniciador R (20 pmoles) (Tabela 1 e 2);
- 3,2 μ L de dNTPs (1,25 mM) cada;
- 0,3 μ L de Taq DNA polimerase (5 U) (Fermentas);
- 5 μ L de tampão de PCR: 200 mM de Tris-HCl, pH 8,0; 500 mM de HCl;
- 3 μ L de MgCl₂ (50 mM);
- 35,5 μ L de água ultra-pura estéril
- 1 μ g de DNA genômico (20 ng/ μ L)

Todos os reagentes citados foram misturados em um único microtubo de 1,5 mL (mistura de reação) para garantir a homogeneidade da reação.

Em cada análise foi usado como controle negativo um microtubo contendo água no lugar do DNA genômico. Os microtubos foram levados ao termociclador (Mastercycler eppendorf) e submetidos ao programa:

- 1 ciclo: 95°C por 5 min;
- 34 ciclos: 94°C por 1 min, 55°C por 1 min (dependendo do iniciador utilizado), 72°C por 1 min;
- 1 ciclo: 72°C por 10 min.

Para confirmação da amplificação da PCR retirou-se uma alíquota de 5 μ L do produto de PCR com a adição de 2 μ L de corante azul de bromofenol (15mL de ficol, 20mL de H₂O e 0,0125g de azul de bromofenol), para a realização da eletroforese em gel de agarose a 1,5%.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores do gene *MLH1* utilizados para amplificação gênica

Nome dos Iniciadores	Sequencia 5' - 3'	Pares de bases	Anelamento
<i>MLH1_1_F</i>	AGGGCCAACGTTAGAAAGG	757	60°C
<i>MLH1_1_R</i>	CGGTAAAGAAACACACGGTCT		
<i>MLH1_2_F</i>	TCTCTTCCCTCTCTCTCACACA	457	60°C
<i>MLH1_2_R</i>	CTGACACATCCCCTGAACAGT		
<i>MLH1_3_F</i>	CTGGAGGCTGAGACATGAAA	638	60°C
<i>MLH1_3_R</i>	TCAGAGGTCTCTGCAGGTAAAA		
<i>MLH1_4_F</i>	CATGTCATCAAAGCAAGTGAGC	469	60°C
<i>MLH1_4_R</i>	CAGACACCTTGCTAGGCACTT		
<i>MLH1_5_F</i>	ACAAGAGCAAAACTCCGTCTC	459	60°C
<i>MLH1_5_R</i>	CATGCCACAAAAGCCAATAG		
<i>MLH1_6_F</i>	CCCCAGTGCATAGTTGAGAAA	494	60°C
<i>MLH1_6_R</i>	CTGGGGAGATGAGAGAAACTG		
<i>MLH1_7_F</i>	GTCTGTGTTTTGATTCAGTCACC	481	60°C
<i>MLH1_7_R</i>	CGAATATTGTCCACGGTTGAG		
<i>MLH1_8_F</i>	GTTTATGGGGGATGGTTTTG	445	55°C
<i>MLH1_8_R</i>	CACGCCACAGAATCTAGGAGA		
<i>MLH1_9_F</i>	ACAGGAGGACCTCAAATGGAC	473	60°C
<i>MLH1_9_R</i>	CAACAGTCAACCAGCAATGAG		
<i>MLH1_10_F</i>	CAGTCCAAGCCGATAGTAAG	461	60°C
<i>MLH1_10_R</i>	GGAAAACGTGTCCTTGTACCT		
<i>MLH1_11_F</i>	CAGTGCCAATATTTGAACACAC	488	60°C
<i>MLH1_11_R</i>	GCCTAGGAACAACAGCACAAT		
<i>MLH1_12_F</i>	TCGGGCAGAATTGCTTCTAT	699	59°C
<i>MLH1_12_R</i>	CAAAGGCAGACAGTGGACAAG		
<i>MLH1_13_F</i>	ACTGATCTTGTTGGCCTTCTG	457	60°C
<i>MLH1_13_R</i>	AGCTGATGCTATTGTGGGTTAG		
<i>MLH1_14_F</i>	CCTCTCTGAGTTCCTGCTTTG	519	60°C
<i>MLH1_14_R</i>	GGAAATGGTCGAACTTGGAT		
<i>MLH1_15_F</i>	CAGCTCTTTGGAGGGGTAAG	493	60°C
<i>MLH1_15_R</i>	CCGGCCGAGTATCAGTAGAT		
<i>MLH1_16_F</i>	GTTGTGGATTGTTGAGGCACT	492	63°C
<i>MLH1_16_R</i>	AGTAGAGACGGGGTTTCATCA		
<i>MLH1_17_F</i>	CGTGCTGTTTGTGAGGATGA	451	63°C
<i>MLH1_17_R</i>	CTGCTGAATATTGCTGGGAATG		
<i>MLH1_18_F</i>	CCTGCTCTCATCCCCTAAT	486	60°C
<i>MLH1_18_R</i>	TTCTGAGGTCACCTGGAGGT		
<i>MLH1_19_F</i>	GAGCTATGATCACACCACTGC	846	60°C
<i>MLH1_19_R</i>	AGCAAGACTCCGTCTCAAAAC		

Tabela 2: Sequência dos iniciadores do gene *MSH2* utilizados para amplificação gênica

Nome dos Iniciadores	Sequencia 5' - 3'	Pares de bases	Anelamento
<i>MSH2_1_F</i>	AAATACTGGGAGGAGGAGGAA	818	59°C
<i>MSH2_1_R</i>	GGAATCCGCACAAGCAC		
<i>MSH2_2_F</i>	CTTCTGCCATGATTGTGAGAC	493	59°C
<i>MSH2_2_R</i>	GACCAGCCAAACTGCAACT		
<i>MSH2_3_F</i>	CAGAGGTTGCAGTGAGTTGAG	693	57,5°C
<i>MSH2_3_R</i>	GGGAGAAAAGATCTGAGGTAA		
<i>MSH2_4_F</i>	GAGTTGTTACCGTTGGGACTAT	600	59°C
<i>MSH2_4_R</i>	AGATCGCGCCATTGTACTC		
<i>MSH2_5_F</i>	GGAAGGAACACCAAGGAAAA	451	59°C
<i>MSH2_5_R</i>	AGTGGAGGAGGGGAGAGAAA		
<i>MSH2_6_F</i>	GGGAGAAATGTACAGTTGAA	970	60°C
<i>MSH2_6_R</i>	CACTAAATCCCACTCCTCTTCC		
<i>MSH2_7_F</i>	CCTCTCAAAGTGCTGGGATTA	561	59°C
<i>MSH2_7_R</i>	AGGTTGCAGTGAGCTGAGATT		
<i>MSH2_8_F</i>	TTAGTGGGAAGCTTTGAGTGC	483	59°C
<i>MSH2_8_R</i>	TCCTTTTCCCATCTGTCACT		
<i>MSH2_9_F</i>	GGGCATATACATCATCAGCACT	535	59°C
<i>MSH2_9_R</i>	GACATCATACAAGGGCCTGTT		
<i>MSH2_10_F</i>	CAGCCTTGGATGGGTTTAC	598	59°C
<i>MSH2_10_R</i>	TCAATGGAGAACAGACGGACT		
<i>MSH2_11_F</i>	TTGTCCCTAAGGAGTTGTTTCG	427	59°C
<i>MSH2_11_R</i>	GTGTCCTACTGTAACATACCATGC		
<i>MSH2_12_F</i>	GCTGGGATTATAGGCGTGAG	784	60°C
<i>MSH2_12_R</i>	ATGCTCTGAACCCATGGAAG		
<i>MSH2_13_F</i>	GGGCAGTAACTCTGTCCACAT	562	59°C
<i>MSH2_13_R</i>	TTCCGTAGCTACCATCAATCAC		
<i>MSH2_14_F</i>	GATTACAGACGTGAGCCATCA	599	59°C
<i>MSH2_14_R</i>	CCAGACTGTGAATTAAGGGGTA		
<i>MSH2_15_F</i>	CCCTTACCTTCCCATGAAATG	1000	57°C
<i>MSH2_15_R</i>	GCCACTTTATTCTCTGTGTCACG		
<i>MSH2_16_F</i>	GCTAATGTGGGAGGAGTTTGA	793	61°C
<i>MSH2_16_R</i>	CCTGGCTCCTGTCAACAGAT		

3.2.3. Sequenciamento Automático

Todos os fragmentos obtidos foram diretamente sequenciados. Utilizou-se o kit BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems®) para realização da reação de sequenciamento. O protocolo incluiu tampão de sequenciamento 5 X, *big dye termination*, PCR, *primer* (5 pmoles) e H₂O.

O procedimento foi realizado em um aparelho termociclador (Mastercycler eppendorf) com programa de ciclagem específico (Figura 10).

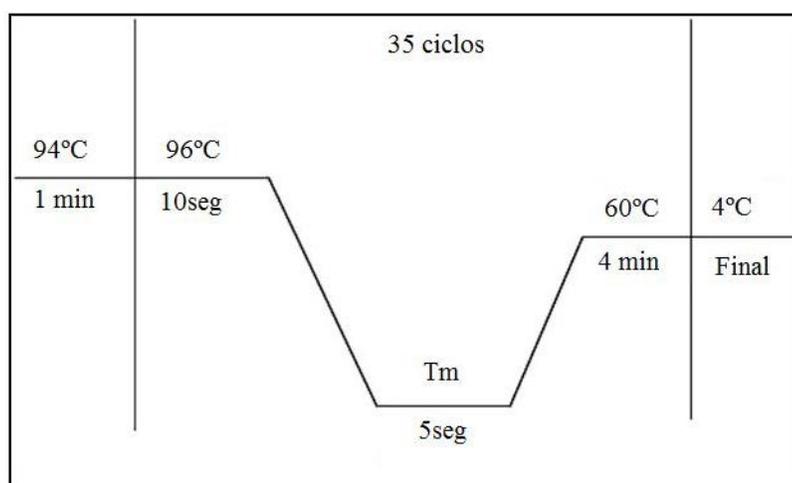


Figura 10: Ciclo utilizado na reação de sequenciamento

Posteriormente, as reações foram purificadas utilizando-se isopropanol e etanol, também para remover as impurezas que poderiam afetar a qualidade da reação de sequenciamento.

Por fim, os fragmentos foram submetidos a um sistema de eletroforese capilar no equipamento Applied Biosystems 3500xl Genetic Analyzer® de 24 capilares para determinação da sequência linear.

Todas as amostras de sequenciamento e da PCR foram realizadas em duplicatas e repetidas para confirmação, quando encontrada qualquer tipo de alteração.

3.3. Análise dos dados

A análise dos sequenciamentos foi realizada com o auxílio do programa *Chromas Lite*TM e DNA Baser (v. 3.5) para a visualização da sequência linear dos eletroferogramas e com o auxílio do programa *Gene Runner*[®] para comparar as sequências obtidas com as postadas como referência em base de dados. As alterações encontradas foram pesquisadas nos seguintes bancos de dados: *NCBI*, *Ensembl Genome Browser (GRch 37.p10)*, *HGMD (Human Genome Mutation Database)*, *dbSNP (short genetic variations_build 37.3)* e *Exome Variant Server*.

3.4. Análise Estatística

Para análise da associação entre as variáveis clínicas e a presença de mutação foram utilizados os testes: teste Exato de Fisher, Qui-quadrado e o teste de Mann-Whitney, com valor de p positivo para valores inferiores a 0,05.

4. RESULTADOS

Foram analisados 46 pacientes com HNPCC, não aparentados, com idade variando de 20 a 55 anos, sendo 42 (91,30%) brancos e 4 (0,89%) não brancos (Tabela 3). Em 21 (45,65%) dos pacientes foram encontradas mutações deletérias. As mutações deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2* estavam na proporção de 34,78% (16 pacientes) e 10,86% (cinco pacientes), respectivamente. As mutações não deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2* estavam na proporção de 65,22% dos pacientes (30 alterações) e 50% dos pacientes (23 alterações), respectivamente. Das mutações com possibilidade de serem patogênicas encontradas nos pacientes, observamos uma mutação de “splicing”, cinco “nonsense”, sete “frameshift” e dez “missense”, como por exemplo a mutação no éxon 8 (Figura 11). Com isso, a proporção de pacientes com mutação com possibilidade de serem deletérias seria de 23/ 46 (50%). As variáveis clínicas encontram-se resumidas na Tabela 3.

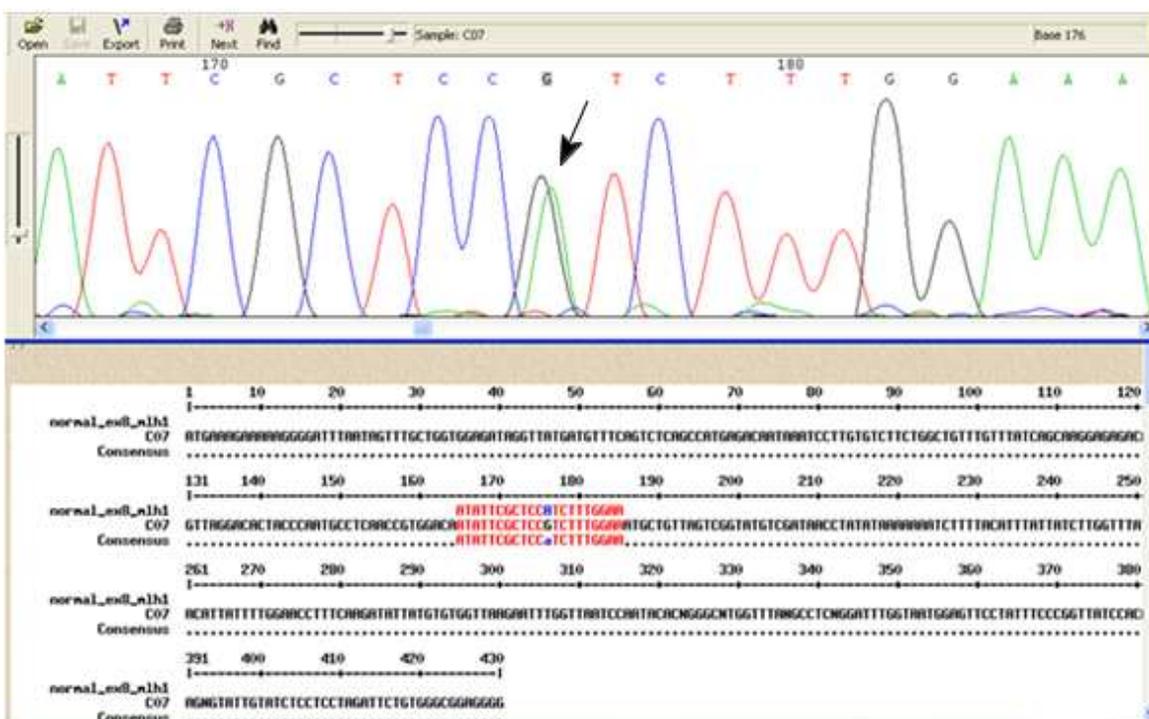


Figura 11: Eletroferograma da mutação missense (c.655A>G) éxon 8 do gene *MLH1*. A seta indica a posição da mutação.

Tabela 3: Descrição dos pacientes com câncer colorretal de acordo com as variáveis: sexo, etnia, idade do diagnóstico, estadiamento e grau de diferenciação do tumor; e descrição das mutações identificadas nos genes *MLH1* e *MSH2*.

N	MLH1				MSH2				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
1	12	rs63750156	c.1056T>A		1	rs63750777	c.54C>G		F	B	24	III	C2	MD
	14	rs63750511	c.1652A>C	missense Asn551Thr	6	rs4987189	c.984C>T							
2	7	rs63750515	c.554T>G	missense Val185Gly					F	B	27	II	B2	BD
	4	rs1800144	c.375A>G											
3	6	rs4647256	c.474C>T						F	B	29	III	C2	MD
4					12	rs63750103	c.1760delG	frameshift Gly587fsX3	M	B	33	III	C2	MD
5	12	rs63750540	c.1381A>T	nonsense Lys461X	15	rs63751093	c.2583A>G		M	B	35	IV	C2	MD
6					7	rs63751059	c.1249delG	frameshift Val417LeufsX21	M	B	36	III	C2	PD
7					1	rs63750777	c.54C>G		M	B	39	II	B2	MD
					6	rs4987189	c.984C>T							
					7	rs63750813	c.1221C>T							
					7	rs63750277	c.1097_1098insA							
8	14	rs63750511	c.1625A>T	missense Gln542Leu	10	-	c.1602T>A		F	B	40	III	C1	BD
9	17	rs63751310	c.1975C>T	nonsense Arg659X					F	B	40	II	C2	MD
	16	COSM25911	c.1788C>T											

N	MLH1				MSH2				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
10	9	rs63751283	c.779T>G	missense Leu260Arg					F	B	41	IV	C2	MD
11					7	rs17224367	c.1168C>T		F	B	41	III	B2	MD
12	8	rs63751711	c.677G>A	missense Arg226Gln	13	rs63750032	c.2061C>G		F	B	41	II	B2	BD
13	8	rs63750085	c.607G>A	missense Asp203Asn					F	B	42	III	C2	PD
14	11	rs63750489	c.901C>T	nonsense Gln301X					M	B	44	III	C2	MD
15	19	rs63750978	c.2142G>A	nonsense Trp714X					M	B	45	III	C2	BD
16	13	rs63749795	c.1459C>T	nonsense Arg487X					F	B	46	III	C2	MD
	15	rs63751657	c.1731G>A											
17					NE				F	B	46	III	C2	MD
18					NE				M	B	46	II	B2	MD
19	12	rs63750791	c.1266C>T						F	B	47	II	B2	MD
20	15	rs63751657	c.1731G>A		9	TMP_ESP_2_47690271	c.1488A>G		M	B	47	II	B2	BD
21					NE				M	B	47	II	C2	MD
22					NE				F	B	47	III	C2	MD
23					NE				M	B	48	II	B2	BD
24	9	rs63750764	c.693delT	frameshift Ile231fsX8					M	B	48	II	B2	BD
25					NE				M	B	49	III	C1	BD

N	MLH1				MSH2				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
26	8	rs63750085	c.607G>A	missense Asp203Asn	3	rs61756462	c.399C>T		M	NB	49	II	B2	PD
	16	COSM25911	c.1788C>T											
	16	rs41295284	c.1820T>A	missense Leu607His										
27	10	rs63750429	c.872delT	frameshift Phe291SerfsX6					M	B	50	I	B2	PD
28	17	rs63751310	c.1975C>T	nonsense Arg659X	13	rs63750003	c.2139G>C		F	B	50	II	B2	MD
	17	rs1800146	c.1959G>T											
29	NE								F	B	50	II	NR	BD
30	NE								F	NB	51	II	B2	MD
31					13	rs63750810	c.2154A>G		M	B	51	II	B2	BD
32	10	rs63751194	c.793C>T	missense Arg265Cys					M	B	21	II	B2	MD
	17	rs1800146	c.1959G>T											
33					4	rs63749936	c.646A>G	missense Ile216Val	M	B	51	II	B1	MD
34	13	rs63750616	c.1413G>A						F	B	52	II	B2	PD
35	NE								F	B	53	I	B2	BD
36	NE								F	NB	54	IV	B2	BD
37	13	rs63750616	c.1413G>A		1	rs63750160	c.187delG	frameshift Val63fsX1	F	B	54	I	B2	MD
38	13	rs63750482	c.1420delC	frameshift Arg474fsX17					F	B	55	I	B1	BD
	14	rs63750137	c.1573T>C											

N	MLH1				MSH2				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
39	14	rs63750137	c.1573T>C		13	rs63751123	c.2010delC	frameshift Pro670fsX15	F	NB	55	I	B1	MD
40	i5	rs4234259	c.453+79A>G		i5	rs71853048	c.942+3delA		F	B	54	/	/	/
	i11	rs2286939	c.1038+86T>C		i6	rs76783230	c.1076+189_1076+190delTT							
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G		i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
					i9	rs3771278	c.1510+111T>C							
					i9	rs3771279	c.1510+115A>G							
					i9	rs3771280	c.1510+118T>C							
					i10	rs3732183	c.1661+12G>A							
					i11	rs3764959	c.1759+107A>G							
				i12	rs2059521	c.2006-127C>T								
41	i5	rs4234259	c.453+79A>G		i1	rs76376509	c.212-15T>C		F	B	45	III	C2	BD
	i11	rs2286939	c.1038+86T>C		i5	rs71853048	c.942+3delA							
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G		i6	rs76783230	c.1076+189_1076+190delTT							
					i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
					i14	rs2059521	c.2006-127C>T							
42	5' UTR	rs1800734	c.-93G>A		i7	rs1981929	c.1277-118G>A		F	B	20			
	8	rs1799977	c.655A>G	missense Ile219Val										
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G											
43	i11	rs2286939	c.1038+86T>C		i5	rs71853048	c.942+3delA		F	B	53	III	C1	BD
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G		i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
	i17	rs2241031	c.1990-121C>T		i10	rs10183143	c.1661+90T>C							
					i12	rs2059521	c.2006-127C>T							

N	MLH1				MSH2				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína	Éxon	Mutação		Tipo / Proteína				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
44	5' UTR	rs1800734	c.-93G>A		5' UTR	rs2303425	c.-118T>C		F	B	52	III	C1	BD
	i5	rs4234259	c.453+79 A>G		i5	rs71853048	c.942+3delA							
	i11	rs2286939	c.1038+86T>C		i6	rs66560884	c.1076+179delT							
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G		i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
					i9	rs3771278	c.1510+111T>C							
					i9	rs3771279	c.1510+115A>G							
					i9	rs3771280	c.1510+118T>C							
					i9	rs12998837	c.1511-9A>T							
					i9	rs3732182	c.1511-91G>T							
					i10	rs3732183	c.1661+12G>A							
45	5' UTR	rs1800734	c.-93G>A		i1	rs76376509	c.212-15T>C		M	B	27	III	C1	BD
	i11	rs59684491	c.1039-31A>T		i5	rs71853048	c.942+3delA							
	i11	rs6771325	c.1039-29A>T		i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
					i9	rs3771278	c.1510+111T>C							
					i9	rs3771279	c.1510+115A>G							
					i9	rs3771280	c.1510+118T>C							
					i11	rs3764959	c.1759+107A>G							
					i12	rs2303428	c.2006-6T>C	splicing						
				i12	rs2059521	c.2006-127C>T								

N	MLH1			MSH2			S	E	ID	Estadiamento		GD	
	Éxon	Mutaçào		Éxon	Mutaçào					Tipo / Proteína	TNM		AC
		rs	Nucleotídeo		rs	Nucleotídeo							
46	i5	rs4647255	c.454-51T>C	i5	rs71853048	c.942+3delA	F	B	55	III	C2	/	
	i10	rs104894999	c.885-81G>C	i6	rs76783230	c.1076+189_1076+190delTT							
				i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
				i11	rs3764959	c.1759+107A>G							
				i12	rs2059521	c.2006-127C>T							
				i16	rs56116962	c.*343C>G							

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli); S = sexo; E = etnia; ID = idade de diagnóstico; TNM = estadiamento do tumor; AC = Astler-Coller; GD = Grau de diferenciação; B = branco; NB = não branco; F= feminino; M= masculino; I = tumor restrito a uma parte do corpo, sem comprometimento linfático; II = comprometimento do sistema linfático ou tumor em mais de um tecido; III = tumor em mais de um tecidos e com comprometimento linfático; IV = presença de metástase a distância; B1 = crescimento do tumor na mucosa da musculatura mas não na muscular própria; B2 = crescimento do tumor pela muscular própria; C1 = estágio B1 com nódulos linfáticos metastáticos regionais; C2 = estágio B2 com linfáticos metastáticos regionais; BD = bem diferenciado; MD = muito diferenciado; PD = pouco diferenciado; NE = nenhuma mutação encontrada.

Foi realizada a análise estatística com relação ao sexo e etnia de acordo com a presença de mutações deletérias no gene *MLH1* e *MSH2* e nenhuma diferença foi encontrada, o mesmo ocorreu quando se comparavam essas variáveis, sexo e etnia, com a presença de mutação deletéria no gene *MLH1* ou no *MSH2* (Tabela 4). Também não foi encontrada, nenhuma associação com as variáveis TNM e Astler-Coller (Tabela 5), grau de diferenciação do tumor (Tabela 6) e tempo de diagnóstico, apenas uma relação entre a idade e presença de mutação deletéria no gene *MLH1*. (Tabela 8). Foi realizada a análise estatística das variáveis TNM e Astler-Coller utilizando a somatória de estágio I + II e III+IV e B1+B2 e C1+C2, mas não foi encontrada nenhuma associação (Tabela 7). Para a análise estatística foram excluídas três mutações de sentido trocado (missense) nas quais não se pôde afirmar o efeito deletério, a saber: Asp203Asn, Ile216Val e Leu607His nos pacientes 13, 26 e 33. Foi excluída também da análise com as variáveis clínicas, a paciente 42, por não apresentar os dados clínicos.

Tabela 4: Distribuição dos pacientes com câncer colorretal segundo sexo e etnia de acordo com presença de mutações deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2*, bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene *MLH1* versus *MSH2*.

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Sexo		Total	p-value	OR	IC-95%
		Feminino	Masculino				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	18	12	30	1,00	0,9	0,244-3,198
	Presença	10	6	16		1	-
Total		28	18	46			
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	26	15	41	0,365	2,6	0,389-17,36
	Presença	2	3	5		1	-
Total		28	18	46			
Gene mutado	<i>MLH1</i>	10	6	16	0,611	2,5	0,320-19,53
	<i>MSH2</i>	2	3	5		1	-
Total		11	10	21			

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Etnia		Total	p-value	OR	IC-95%
		Caucasóide	Não caucasóide				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	26	4	30	0,282	-	-
	Presença	16	0	16		-	-
Total		42	4	46			
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	38	3	41	0,379	3,167	0,263-3,806
	Presença	4	1	5		1	-
Total		42	4	45			
Gene mutado	<i>MLH1</i>	14	0	14	0,238	-	-
	<i>MSH2</i>	4	1	5		-	-
Total		19	2	21			

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli), OR = odds ratio, IC = intervalo de confiança, % = porcentagem.

Análise estatística realizada pelo teste Exato de Fisher, com valor de *p* positivo para valores inferiores a 0,05.

Tabela 5: Distribuição dos pacientes com câncer colorretal segundo TNM e Astler-Coller de acordo com presença de mutações deletérias no gene *MLH1* e *MSH2*, bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene *MLH1* versus *MSH2*.

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		TNM				Total	p-value
		I	II	III	IV		
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	3	12	13	1	29	0,611
	Presença	2	6	5	2	15	
Total		5	18	18	3	44	
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	3	18	15	3	39	0,064
	Presença	2	0	3	0	5	
Total		5	18	18	3	44	
Gene mutado	<i>MLH1</i>	2	6	5	2	15	0,198
	<i>MSH2</i>	2	0	3	0	5	
Total		4	6	8	2	20	

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Astler-Coller				Total	p-value
		B1	B2	C1	C2		
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	2	13	4	9	28	0,768
	Presença	1	6	1	7	1	
Total		3	19	5	16	43	
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	2	18	4	14	38	0,479
	Presença	1	1	1	2	5	
Total		3	19	5	16	43	
Gene mutado	<i>MLH1</i>	1	6	1	7	15	0,615
	<i>MSH2</i>	1	1	1	2	5	
Total		2	7	2	9	21	

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli); TNM = estadiamento do tumor; I = tumor restrito a uma parte do corpo, sem comprometimento linfático; II = comprometimento do sistema linfático ou tumor em mais de um tecido; III = tumor em mais de um tecidos e com comprometimento linfático; IV = presença de metástase a distância; B1 = crescimento do tumor na mucosa da musculatura mas não na muscular própria; B2 = crescimento do tumor pela muscular própria; C1 = estágio B1 com nódulos linfáticos metastáticos regionais; C2 = estágio B2 com linfáticos metastáticos regionais.

Análise estatística realizada pelo teste χ^2 , com valor de *p* positivo para valores inferiores a 0,05.

Tabela 6: Distribuição dos pacientes com câncer colorretal segundo o grau de diferenciação do tumor de acordo com presença de mutações deletérias no gene *MLH1* e *MSH2*, bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene *MLH1* versus *MSH2*.

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Grau de diferenciação do tumor			Total	p-value
		BD	MD	PD		
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	11	13	4	28	0,747
	Presença	6	8	1	15	
Total		17	21	5	43	
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	16	18	4	38	0,584
	Presença	1	3	1	5	
Total		17	21	5	43	
Gene mutado	<i>MLH1</i>	6	8	1	15	0,570
	<i>MSH2</i>	1	3	1	5	
Total		7	11	2	21	

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli);

BD = bem diferenciado; MD = muito diferenciado; PD = pouco diferenciado.

Análise estatística realizada pelo teste χ^2 com valor de *p* positivo para valores inferiores a 0,05.

Tabela 7: Distribuição dos pacientes com câncer colorretal pelo TNM, Astler-Coller grau de diferenciação do tumor de acordo com presença de mutações deletérias no gene *MLH1* e *MSH2*, bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene *MLH1* versus *MSH2*.

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		TNM		Total	p-value	OR	IC – 95%
		I+II	III+IV				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	15	14	29		0,938	0,269-3,27
	Presença	8	7	16	1,000	1	-
Total		23	22	44			
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	21	18	39		1,728	0,233-15,9
	Presença	2	3	5	0,658	1	-
Total		23	22	44			
Gene mutado	<i>MLH1</i>	8	7	15		1,714	0,219-13,4
	<i>MSH2</i>	2	3	5	1,000	1	-
Total		10	10	21			
Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Astler-Coller		Total	p-value		
		B1+B2	C1+C2				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	15	13	28		1,319	0,375-4,636
	Presença	7	8	15	0,755	1	-
Total		22	21	43			
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	20	18	38		1,667	0,221-15,19
	Presença	2	3	5	0,664	1	-
Total		22	21	43			
Gene mutado	<i>MLH1</i>	7	8	15		1,313	0,168-10,26
	<i>MSH2</i>	2	3	5	1,000	1	-
Total		9	11	21			
Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>		Grau de diferenciação		Total	p-value		
		BD	MD+PD				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	11	17	28		0,971	0,263-3,7
	Presença	6	9	15	1,000	1	-
Total		17	26	43			
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	16	22	38		2,909	0,296-28,55
	Presença	1	4	5	0,633	1	-
Total		17	26	43			
Gene mutado	<i>MLH1</i>	6	9	15		2,667	0,237-30,06
	<i>MSH2</i>	1	4	5	0,613	1	-
Total		7	13	20			

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli); TNM = estadiamento do tumor; I = tumor restrito a uma parte do corpo, sem comprometimento linfático; II = comprometimento do sistema linfático ou tumor em mais de um tecido; III = tumor em mais de um tecidos e com comprometimento linfático; IV = presença de metástase a distância; B1 = crescimento do tumor na mucosa da musculatura mas não na muscular própria; B2 = crescimento do tumor pela muscular própria; C1 = estágio B1 com nódulos linfáticos metastáticos regionais; C2 = estágio B2 com linfáticos metastáticos regionais; BD = bem diferenciado; MD = muito diferenciado; PD = pouco diferenciado. Análise estatística realizada pelo teste Exato de Fisher, com valor de *p* positivo para valores inferiores a 0,05.

Tabela 8: Associação dos pacientes com o tempo de diagnóstico do câncer colorretal com a presença de mutações deletérias no gene *MLH1* e *MSH2*, bem como em comparação entre as mutações deletérias no gene *MLH1* versus *MSH2*.

Distribuição pelos genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i>	N	Média	Desvio padrão	Intervalo de confiança de 95% para média		Mínimo	Máximo	p	
				Limite inferior	Limite superior				
Mutação no gene <i>MLH1</i>	Ausência	30	46,77	7,50	43,964	49,569	27,0	55,0	0,009
	Presença	16	39,19	10,86	33,402	44,973	20,0	55,0	
	Total	46	44,13	9,43	41,330	46,931	20,0	55,0	
Mutação no gene <i>MSH2</i>	Ausência	41	44,51	9,08	41,647	47,377	20,0	55,0	0,732
	Presença	5	41,00	12,75	25,172	56,828	27,0	55,0	
	Total	46	44,13	9,43	41,330	46,931	20,0	55,0	
Gene Mutado	Ausência	16	39,19	10,86	33,402	44,973	20,0	55,0	0,842
	Presença	5	41,00	12,75	25,172	56,828	27,0	55,0	
	Total	21	39,62	11,02	34,601	44,638	20,0	55,0	

MLH1 = mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis type 2 (E. coli); *MSH2* = mutS homolog 2, colon cancer, nonpolyposis type 1 (E. coli);

N = número de pacientes; IC = intervalo de confiança; % = porcentagem. Análise estatística realizada pelo teste de Mann-Whitney, com valor de *p* positivo para valores inferiores a 0,05.

4.1. Análise Familiar

Foi possível analisar duas famílias de pacientes que apresentam HNPCC. Familiares da paciente 42 (Família I) e familiar do paciente 45 (Família II).

Família I

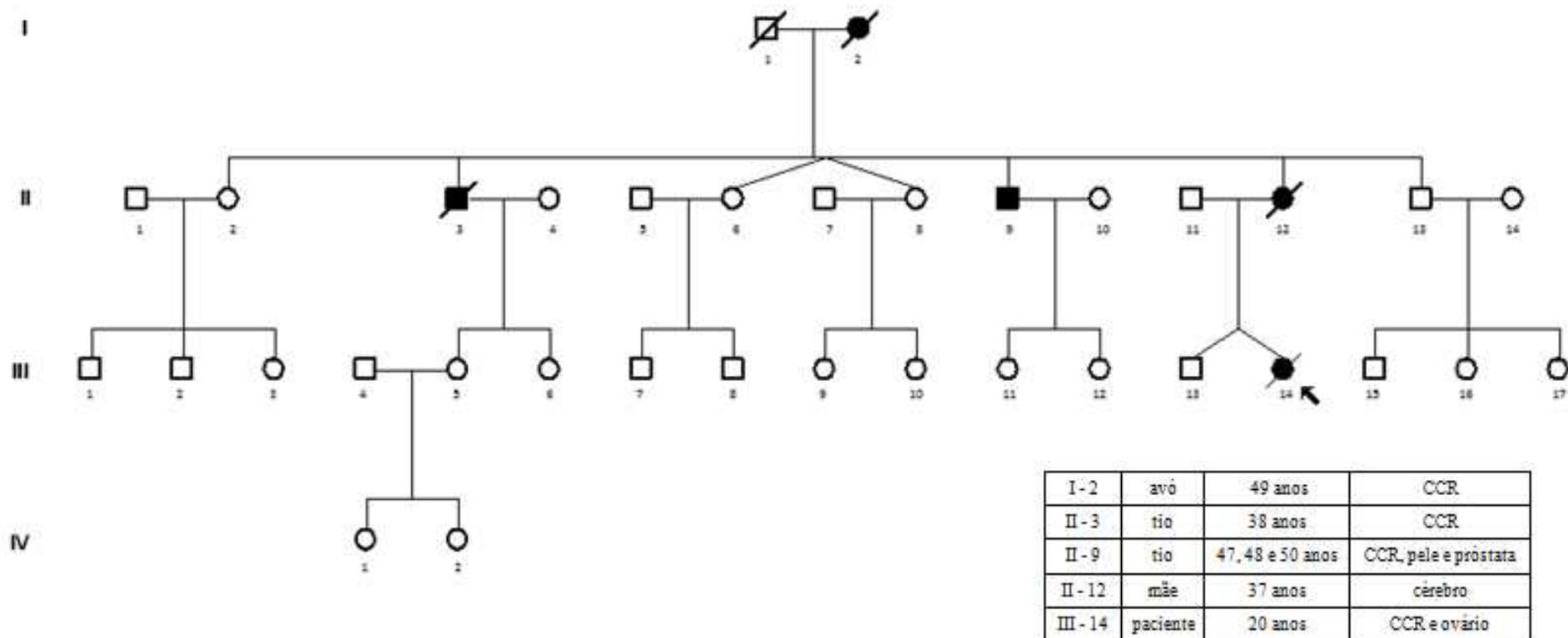


Figura 12: Heredograma da família I.

O heredograma da família I está apresentado na Figura 12, onde verificamos não haver casamentos consanguíneos e segregação em três gerações, afetando indivíduos de ambos os sexos. As idades dos indivíduos e genótipos encontrados estão resumidos na Tabela 9.

Todos os éxons dos genes *MLH1* e *MSH2* foram investigados nos indivíduos 11 e 30 (paciente 42). As alterações encontradas na paciente foram averiguadas no restante da família (Tabela 9).

Como podemos observar na figura 12, quatro indivíduos com HNPCC foram diagnosticados com menos de 50 anos de idade. Investigamos na família I, a presença das mutações c.-93G>A, c.655A>G, c.1668-19A>G no gene *MLH1* e c.1277-118G>A no gene *MSH2*.

Identificamos nove indivíduos heterozigotos com a mutação -93G> A e quatro homozigotos AA. Nenhum dos indivíduos homozigóticos possuem qualquer alteração clínica. Com relação à mutação missense c.655A>G, a paciente é heterozigota para essa mutação, mas o tio, que também é afetado, não a possui. Temos também outros seis familiares que possuem o alelo G dessa mutação, mas nenhum apresentou até o momento qualquer alteração clínica, sendo que a idade desses familiares varia de 25 a 34 anos.

Tabela 9: Resultado das análises dos genes *MLH1* e *MSH2* na família I

N	Lab. genética	ID	Idade em 2011	Genótipos			
				<i>MLH1</i>			<i>MSH2</i>
				rs1800734	rs1799977	rs9876116	rs1981929
				c.-93G>A	c.655A>G missense	c.1668-19A>G	c.1277-118G>A
1	2698		47	G/A	A/A	A/A	G/A
2	391		30	A/A	A/A	A/A	G/A
3	1313		28	A/A	A/A	A/A	G/A
4	443		30	G/G	A/G	A/G	G/A
5	444		61	G/A	A/A	A/A	G/A
6	445		55	G/A	A/A	A/A	G/A
7	446		29	G/G	A/G	A/G	G/A
8	447		26	G/G	A/G	A/G	G/A
9	477		55	G/A	A/A	A/A	G/A
10	478		24	G/A	A/A	A/A	G/A
11	479		19	A/A	A/A	A/A	A/A
12	483		34	G/G	A/G	A/G	G/G
13	546		3	G/A	A/A	A/A	G/A
14	563		27	G/G	A/G	A/G	G/A
15	564		26	A/A	A/A	A/A	G/A
16	565		23	G/A	A/A	A/G	G/A
17	651		25	G/G	A/G	A/G	G/A
11* (tio)	562	47	51	G/A	A/A	A/A	G/G
42 (paciente)	261	20	-	G/A	A/G	A/G	G/A

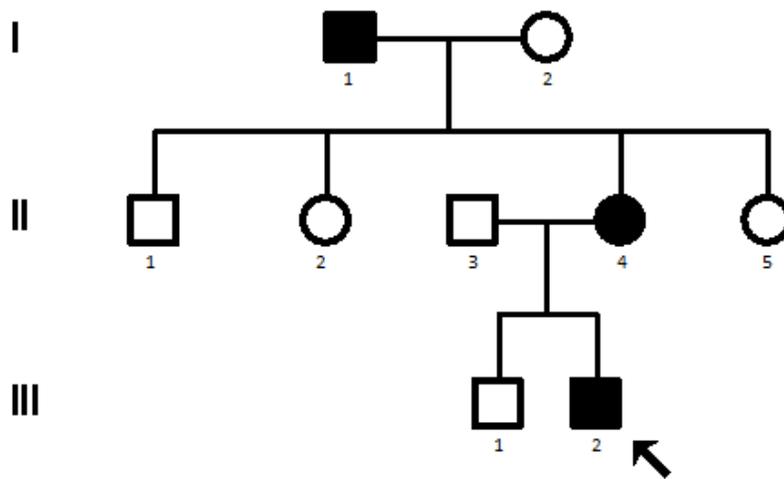
*Resultados extra do individuo 11 da família I:

Gene *MLH1* íntron 2 c.208-150delA ou rs111908792.

Gene *MSH2* íntron 11 c.1760-127T>A ou rs17224808

Gene *MSH2* íntron 12 c.2005+43_2005+46delTTTT ou rs76761634

Família II



I - 1	avô	66, 75 anos	próstata e reto
II - 4	mãe	46 anos	reto
III - 2	paciente	27 anos	CCR

Figura 13: Heredograma da família II

O heredograma da família II está apresentado na Figura 13, onde não encontramos casamentos consanguíneos, sendo novamente possível verificar que a doença segregou por três gerações afetando ambos os sexos. Foram analisados todos os éxons dos genes *MLH1* e *MSH2* dos indivíduos 6 e 9 (paciente 45) da família II. As idades de diagnóstico, grau de parentesco e tipo de câncer dos indivíduos estão na legenda da figura 13.

Encontramos no indivíduo 6 (mãe), sete alterações intrônicas e uma alteração na região promotora do gene *MLH1* e três alterações intrônicas no gene *MSH2* (Tabela 10). No indivíduo 9 (paciente 45) encontramos duas alterações intrônicas e uma alteração na região promotora do gene *MLH1* e nove alterações intrônicas no gene *MSH2*, sendo uma delas na região de splicing (deletéria).

Tabela 10: Resultado das análises dos genes *MLH1* e *MSH2* no indivíduo 6 da família II

N	<i>MLH1</i>				<i>MSH2</i>				S	E	ID	Estadiamento		GD
	Éxon	Mutação		Tipo	Éxon	Mutação		Tipo				TNM	AC	
		rs	Nucleotídeo			rs	Nucleotídeo							
06 mãe	5' UTR	rs1800734	c.-93G>A		i1	rs2303426	c.211+9C>G		F	C	50	I	B1	/
	i5	rs4234259	c.453+79A>G		i7	rs1981929	c.1277-118G>A							
	i6	rs4647257	c.546-75A>C		i12	rs2059521	c.2006-127C>T							
	i11	rs59684491	c.1039-31A>T											
	i11	rs6771325	c.1039-29A>T											
	i14	rs9876116	c.1668-19A>G											
	i16	rs145050866	c.1897-145C>G											
	i17	rs2241031	c.1990-121C>T											

5. DISCUSSÃO

5.1. Fase I

A dificuldade em avaliar com segurança o potencial deletério de mutações é um grande desafio nos diagnósticos e aconselhamento genético de famílias com HNPCC (Raevaara *et al.*, 2005).

As mutações encontradas foram: uma de junção ou splicing (4,35%), cinco nonsense (21,74%), sete frameshift (30,43%) e dez missense (43,48%). Diferente do que Valentim e colaboradores encontraram em 2011, em 123 pacientes brasileiros, uruguaios e argentinos, que foram: splicing (23,52%), nonsense (35,3%), frameshift (26,47%) e missense (9%). Essa diferença pode ser explicada pela heterogeneidade de pacientes de várias regiões sul-americanas.

Em nosso estudo, a alteração c.607G>A (rs63750085) ou p.Asp203Asn do gene *MLH1* localizado no éxon 8, tipo missense foi detectada em dois pacientes com HNPCC e um único trabalho na literatura descreve esta mutação (Chadwick *et al.*, 2001 nos Estados Unidos) em uma paciente com câncer de endométrio, ela apresentava histórico familiar de CCR e outros cânceres.

A mutação tipo nonsense, c.1975C>T (rs63751310 ou Arg659X no éxon 17 do gene *MLH1*) foi descrita como deletéria no estudo dinamarquês (Nilbert *et al.*, 2009) e no trabalho brasileiro (Valentin *et al.*, 2011). Nós detectamos esta mutação em dois de nossos pacientes.

Os resultados a seguir foram observados em um indivíduo, cada.

Kohonen-Corish e colaboradores em 1996 na Austrália e Raevaara e colaboradores em 2005 na Finlândia, descreveram a mutação c.554T>G (rs63750515 tipo missense) como deletéria para o HNPCC. Nesta mutação ocorre a substituição de T>G no éxon 7 do gene

MLH1 no códon 185, o que causou uma troca de aminoácido de valina para glicina (Kohonen-Corish *et al.*, 2005).

Alguns autores publicaram a alteração c.677G>A (rs63751711 ou Arg226Gln, gene *MLH1* no éxon 8) tipo missense, sem significância estatística para o HNPCC (Zhao *et al.*, 2008; Shen *et al.*, 2008; Papp *et al.*, 2007 e Spaepen *et al.*, 2006). Um estudo brasileiro publicou a mutação como sendo deletéria para o HNPCC (Valentin *et al.*, 2011).

Valentin e colaboradores em 2011 descreveram a alteração c.779T>G (rs63751283 ou Leu260Arg) no gene *MLH1* no éxon 9 tipo missense, como deletéria para o HNPCC.

Han e colaboradores publicaram, em 1996 na Coreia, o caso de um paciente com HNPCC portador da mutação c.693delT (rs63750764 ou Ile231fsX8) éxon 9 do gene *MLH1*, tipo frameshift.

Leach e colaboradores em 2002 nos Estados Unidos, publicaram a alteração c.872delT (rs63750429 ou Phe291SerfsX6) tipo frameshift, em carcinoma de células renais.

A mutação missense h*MLH1* no éxon 10 (c.793C>T ou rs63751194 ou p. Arg265Cys) foi identificada pela primeira vez em 1999 por Wahlberg e colaboradores, em um membro de uma família com HNPCC, no Hospital Karolinska em Estocolmo, na Suécia. Essa mutação foi sugerida pelos autores como possível responsável pela doença. Anos mais tarde, Lagerstedt Robinson e colaboradores, em 2007, publicaram o mesmo caso, sugerindo que um outro fator de predisposição possa ter contribuído para o CCR nesta família, pois o paciente não herdou a mutação de nenhum dos seus familiares e também não encontrou a mutação nos 96 indivíduos controles analisados.

Hendriks e colaboradores em 2003, na Holanda, e Koehler e colaboradores em 2007, na Alemanha, também descreveram a mutação c.793C>T em apenas um membro das famílias pesquisadas e não encontraram associação com o HNPCC.

Yan e colaboradores em 2008, na China, consideraram que a mutação c.901C>T (rs63750489 ou p.Gln301X) seria deletéria pelo fato de ser uma mutação nonsense. Outros trabalhos não afirmaram se essa mutação seria deletéria ou não (Ponz de Leon *et al.*, 2004 na Itália e de Jong *et al.*, 2004 na Holanda).

Para a mutação c.1381A>T no gene *MLH1* éxon 12 (rs63750540 ou Lys461X) tipo nonsense, alguns autores não afirmaram se a mutação seria deletéria (Syngal *et al.*, 1999; Terdiman *et al.*, 2001 e Wagner *et al.*, 2003).

Um trabalho brasileiro realizado por Valentin e colaboradores em 2011 e um trabalho alemão (Mangold *et al.*, 2005) publicaram como deletéria a mutação c.1459C>T (rs63749795 ou Arg487X) éxon 13 do gene *MLH1*, tipo nonsense para o HNPCC.

Caldes e colaboradores em 2002 na Espanha, também encontraram a mutação frameshift c.1420delC (rs63750482 ou Arg474fsX17) como deletéria para os portadores de HNPCC no gene *MLH1* éxon 13.

Para a alteração c.1652A>C (rs63750511 ou Asn551Thr) no gene *MLH1* éxon 14 tipo missense, Takahashi e colaboradores em 2007 no Japão e Tournier e colaboradores em 2008 na França descreveram esta alteração em pacientes com HNPCC.

O trabalho japonês de Takahashi e colaboradores em 2007, também descreveu a mutação c.1625A>T (rs63750511 ou Gln542Leu) tipo missense no éxon 14 do gene *MLH1*.

Barnetson e colaboradores em 2008, no Reino Unido, não conseguiram afirmar se a mutação c.1820T>A seria deletéria, é uma mutação tipo missense (rs41295284 ou Leu607His)

para o CCR e Valentin e colaboradores em 2011, descreveram a mutação como não deletéria para o HNPCC, esta mutação se encontra no éxon 16 do gene *MLH1*.

Hutter e colaboradores em 1996, na Suíça, e Planck e colaboradores em 1999, na Suécia, descreveram a mutação nonsense c.2142G>A (rs63750978 ou Trp714X) éxon 19 do gene *MLH1* em famílias portadoras de HNPCC.

Mangold e colaboradores em 2005, na Alemanha, publicaram a mutação frameshift c.187delG (rs63750160 ou Val63fsX1) éxon 1 do gene *MSH2* em um paciente de uma família com HNPCC, descrevendo-a como deletéria.

Para a alteração c.646A>G (rs63749936 ou Ile216Val) encontrada no éxon 4 do gene *MSH2* tipo missense e de junção Bushman e colaboradores em 2010, descreveram esta alteração em um indivíduo na África do Sul (NCBI, 2013).

Rossi e colaboradores do Hospital do Câncer A. C. Camargo de São Paulo, Brasil, descreveram em 2002 a mutação frameshift c.1249delG (rs63751059 ou Val417LeufsX21) éxon 7 do gene *MSH2* em um paciente com CCR com histórico de CCR na família.

Para a mutação frameshift c.1760delG (rs63750103 ou Gly587fsX3) éxon 12 do gene *MSH2*, Chan e colaboradores publicaram em 1999 na China, um paciente com CCR de 29 anos sem histórico de câncer familiar.

Lin e colaboradores em 1999 detectaram a mutação frameshift c.2010delC (rs63751123 ou Pro670fsX15) éxon 13 do gene *MSH2* em um paciente com HNPCC nos Estados Unidos.

Portanto, do total de 21 mutações encontradas, sugerimos que as deletérias seriam c.554T>G, c.779T>G, c.1459C>T, c.1420delC, c.1975C>T e c.2142G>A do gene *MLH1* e c.187delG do gene *MSH2* e as mutações ainda discutíveis são c.607G>A, c.677G>A, c.693delT,

c.872delT, c.793C>T, c.901C>T, c.1381A>T, c.1652A>C, c.1625A>T e c.1820T>A do gene *MLH1* e c.646A>G, c.1249delG, c.1760delG e c.2010delC do gene *MSH2*.

As mutações não deletérias nos genes *MLH1* e *MSH2* estavam na proporção de 65,22% dos pacientes (30 alterações) e 50% dos pacientes (23 alterações), respectivamente. Valentin e colaboradores, em 2011, e Nilbert e colaboradores, em 2009, entre outros, também detectaram mutações não deletérias, mostrando a variabilidade mutacional elevada existente nesses genes.

Com relação as variáveis clínicas, a única correlação significativa foi a relação entre idade de manifestação e presença da mutação deletéria no gene *MLH1*. Os indivíduos que apresentam a mutação deletéria germinativa no gene *MLH1* apresentam mais cedo o tumor. Talvez esse gene tenha maior fragilidade mutacional do que os outros genes envolvidos na etiologia do HNPCC e com isso ocorreria a segunda mutação mais precocemente do que os indivíduos com mutação no outros genes.

5.2. Fase II

5.2.1. Família I

A alteração -93G>A (rs1800734) encontrada na região 5' UTR do gene *MLH1* foi descrita em vários membros da família, sendo indicada como um alelo de baixa penetrância para CCR. Nenhuma associação entre -93G>A e risco CCR até agora foi demonstrado (Raptis *et al.*, 2007; Allan *et al.*, 2008; Campbell *et al.*, 2009; Mei *et al.*, 2010).

Zahary e colaboradores, em 2012 encontraram a mutação -93G>A na região central do promotor do gene *MLH1*, 93 nucleotídeos à montante do sítio de início da transcrição. Essa mutação foi identificada em 61,8% dos pacientes, indicando uma predominância dessa variação entre os malaios. Estudos funcionais demonstraram que a região promotora do *MLH1*, a partir

da posição -184 do nucleotídeo até o sítio de início da transcrição (região em que a alteração G> A ocorre), é essencial para a transcrição de gene *MLH1* (Ito *et al.*, 1999).

Nos últimos 10 anos, dezenas de estudos abordaram associações entre o risco de CCR e polimorfismos candidatos no reparo do DNA. Whiffin e colaboradores (2011) conduziram uma meta-análise com dados anteriormente publicados e mostraram que o polimorfismo -93G> A não é um determinante para o risco de CCR [odds ratio (OR), por alelo = 1,06, 95%, intervalo de confiança (CI) 1,00–1,11, P = 0,037].

Beiner e colaboradores em 2006, em um trabalho realizado no Canadá, descreveram que portadoras de *MLH1*-93 alelo A apresentam um risco 1,5 vezes maior de desenvolver câncer de endométrio comparados com os controles (95% CI= 1,2-2,0, P = 0,001). O risco foi maior para portadoras homocigotas (OR= 1,9, 95% CI, 1,2-3,2, P = 0,009).

Chen e colaboradores (2007) encontraram uma associação direta entre a metilação do promotor e o -93G> A.

Para a mutação c.655A>G (rs1799977) tipo missense, no gene *MLH1*, Kim e colaboradores (2004) descreveram uma correlação entre o genótipo constitucional rs1799977 e a expressão da proteína *MLH1* em tumores colorretais, enquanto que, mais recentemente, Santibanez Koref e colaboradores em 2010 no Reino Unido publicaram valor de $p = 0,07$ para o c.655A>G. Não foi encontrada associação entre o polimorfismo e início da doença em portadores da mutação.

Para ambos (c.-93A> G e c.655A>G) os polimorfismos, há relatos parcialmente conflitantes em relação à associação para o risco de diferentes tipos de cancer (Krajinovic *et al.*, 2002; Park *et al.*, 2004;. Lee *et al.*, 2005;. Beiner *et al.*, 2006;. Landi *et al.*, 2006;. Mei *et al.*, 2006;. Yu *et al.*, 2006; Harley *et al.*, 2008).

O polimorfismo c.655A>G se encontra no éxon 8 do gene *MLH1* e é conservada durante a evolução, o qual pode ser visto como um sinal de sua importância para o bom funcionamento da proteína (Trojan *et al.*, 2002). Berndt e colaboradores (2007) investigaram o possível papel de c.655A>G no CCR usando, como base, um grupo da comunidade branca americana e não foram capazes de encontrar qualquer associação com tumores, em nenhum local (proximal ou distal do cólon, reto).

A alteração c.655A>G ou Ile219Val foi descrita como sendo a mais frequente polimorfismo exônico de *MLH1* (Tenesa e Dunlop, 2009). É improvável que a substituição isoleucina / valina afete a capacidade de reparo mismatch (Houlston *et al.*, 2008), mas o alelo variante pode afetar a velocidade e fidelidade da tradução (Pritchard e Cox, 2002). A implicação deste polimorfismo no CCR ainda é controversa. O c.655A>G foi associado com colite ulcerativa refratária (Gorlov *et al.*, 2008), risco de aumento de leucemia linfoblástica aguda infantil (Zhou *et al.*, 2005) e de câncer de mama (Zhou *et al.*, 2004). No entanto, outras investigações não conseguiram observar associações diretas com o CCR (Liu *et al.*, 2003, Sasieni, 1997).

Um estudo de associação, realizado com 140 pacientes com CCR esporádico e 125 controles na Espanha, (Nejda *et al.*, 2009) revelou que os portadores de G (AG ou genótipo GG) apresentaram um maior risco de desenvolver CCR em comparação aos homocigotos AA. O OR para heterocigoto AG foi de 2,55 (95% CI =1,48 – 4,39, P=0,01), 2,48 (95% CI =1,20 - 5.11; P= 0,01) para homocigoto GG e 2,53 (95% CI =1,53-4,20; P= 0,001) quando consideramos homocigoto (GG) e heterocigoto (AG) em conjunto. Comparando as frequências genóticas (c.655A>G) da análise caso controle, considerando-se as mulheres e homens separadamente, indicaram diferenças de gênero em risco CCR. Os homens portadores de G

apresentaram um risco mais elevado de CCR em comparação com indivíduos homocigotos AA tipo selvagem (OR: AG=3,05; 95% CI =1,49-6,26, P=0.002; OR: GG =3,60; 95% CI=1,29-10,03, P=0,014 e OR: GG + AG=3,19; 95% CI=1,63-6,22, P=0,001). Já em mulheres os genótipos da mutação c.655A>G não influenciaram significativamente o risco de CCR.

As variações c.1668-19A>G (rs9876116) no gene *MLH1*, localizada no íntron 14 e c.1277-118G>A (rs1981929) localizada no íntron 7 do gene *MLH2*, foram descritas na literatura como polimorfismos neutros.

Na Família I, dois dos quatro pacientes com HNPCC foram heterocigotos para o alelo A da mutação -93 e outro, examinando os filhos, podemos dizer que pelo menos um possui um alelo -93A. Temos também sete indivíduos heterocigotos que, até o momento, não são afetados pela doença, sendo que alguns desses indivíduos possuem mais de 50 anos de idade e não apresentaram sinais da doença. Se apenas os indivíduos afetados fossem analisados, o polimorfismo -93 G> A seria considerado deletérico, no entanto, tendo em conta a frequência na população geral de 17% em caucasianos (Ensembl, 2013) e a análise da família, concluímos que essa mutação trata-se provavelmente de um polimorfismo neutro. Por outro lado, com relação à mutação missense c.655A>G, a paciente é heterocigota para essa mutação, mas o tio, que também é afetado, não a possui, de forma que não podemos descartar a possibilidade do tio ter um tumor adquirido. Na família temos também outros seis familiares que possuem o alelo G dessa mutação e não apresentaram até o momento tumor, mas são indivíduos jovens e que podem ainda apresentar o tumor. Com isso, não podemos excluir essa mutação como sendo deletéria.

Portanto, torna-se claro a importância do estudo da família e frequência das mutações na população em geral, para indicar se uma mutação é deletéria ou não.

5.2.2. Família II

Na família II investigada foram encontradas várias mutações, mas apenas uma, por tratar-se de uma mutação no sítio acceptor de splicing, poderia ter um efeito deletério e estar correlacionada com a predisposição ao HNPCC.

A mutação c.2006-6T>C (rs2303428) encontra-se no íntron 12 do gene *MSH2*, esta alteração foi associada com câncer de pulmão por Doherty e colaboradores em 2013, em um trabalho nos Estados Unidos. Beiner e colaboradores em 2006, no Canadá, apresentaram um aumento no risco do desenvolvimento de câncer de endométrio (OR: 1,4; 95% CI, 1,0-1,9; P = 0,05).

Uma dificuldade encontrada foi que somente o paciente apresentou essa mutação, não sendo encontrada na mãe, que teve a doença em uma idade limítrofe (46 anos). Essa mutação pode ter sido herdada do lado paterno, mas não tivemos acesso a informações ou material biológico para análise. Por outro lado, o avô é acometido em idade avançada, podendo tratar-se de uma neoplasia adquirida. Não podemos também afastar a hipótese de que essa possa ser uma mutação *de novo* no paciente e que a mãe possa ter mutação em outro gene relacionado ao HNPCC.

Para um esclarecimento dessa questão seria necessário investigar outros genes na mãe que estejam relacionados ao HNPCC e ter acesso às informações e material biológico do lado paterno.

A partir da análise dessas duas famílias podemos verificar a dificuldade de se realizar um adequado diagnóstico molecular da doença. Esse fato é importante porque muitos familiares procuram serviços de aconselhamento genético com intenção de realizar teste preditivo.

Portanto, sem um diagnóstico molecular acurado, existe um grande risco de testes com resultados falsos que podem levar a situações de risco dos indivíduos, uma vez que após determinação da mutação que leva à predisposição hereditária do tumor naquela família, outros familiares assintomáticos ao realizar o teste preditivo e terem um resultado negativo passam a ter o risco da população geral daquele tumor e, portanto, acabam por sair de protocolos de profilaxia. Daí a grande importância de um diagnóstico molecular adequado e a análise familiar tem um papel fundamental.

6. CONCLUSÕES

1. Foi possível identificar 23 mutações potencialmente deletérias entre os pacientes com HNPCC utilizando o sequenciamento dos genes *MLH1* e *MSH2*, com uma porcentagem de detecção de 50%.
2. Parece não haver variações nas características clínicas do tumor quando a mutação germinativa ocorre no gene *MLH1* ou *MSH2*, com exceção da relação entre idade e presença de mutação deletéria no gene *MLH1*.
3. Como ocorre no resto do mundo a doença mostrou-se extremamente heterogênea com relação aos aspectos moleculares, pois apenas duas mutações se repetiram em dois pacientes.
4. A partir da análise das duas famílias foi possível mostrar a dificuldade para estabelecer a presença da mutação germinativa deletéria que poderia levar à predisposição ao HNPCC, bem como a importância da análise familiar no diagnóstico molecular dessa alteração.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, *et al.* Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer*, vol. 81, p.214-218, 1999.

Alexandrov K, Rojas M, Kadlubar FF, Lang NP, Bartsch H. Evidence of anti-benzo(a)pyrene diolepoxide DNA adduct formation in human colon mucosa. *Carcinogenesis*, 17(9): 2081-83, 1996.

Allan JM, Shorto J, Adlard J, Bury J, Coggins R, George R, *et al.* *MLH1* -93G>A promoter polymorphism and risk of mismatch repair deficient colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2008 Nov 15;123(10):2456-9.

Barnes DE, Lindahl T, Sedgwick B. DNA repair. *Curr Opin Cell Biol* 1993;5:424-33.

Barnetson RA, Cartwright N, van Vliet A, Haq N, Drew K, Farrington S, *et al.* Classification of ambiguous mutations in DNA mismatch repair genes identified in a population-based study of colorectal cancer. *Hum Mutat*. 2008 Mar;29(3):367-74.

Beiner ME, Rosen B, Fyles A, Harley I, Pal T, Siminovitch K, *et al.* Endometrial cancer risk is associated with variants of the mismatch repair genes *MLH1* and *MSH2*. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2006 Sep;15(9):1636-40.

Berndt SI, Platz EA, Fallin MD, Thuita LW, Hoffman SC, Helzlsouer KJ. Mismatch repair polymorphisms and the risk of colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2007 Apr 1;120(7):1548-54.

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. *Cancer Research*, vol. 58, p.5248-5257, 1998.

Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Familial Cancer*, vol. 4, p.211-218, 2005.

Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ* 321: 805-808, 2000.

Caldes T, Godino J, de la Hoya M, Garcia Carbonero I, Perez Segura P, Eng C, *et al.* Prevalence of germline mutations of *MLH1* and *MSH2* in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families from Spain. *Int J Cancer*. 2002 Apr 10;98(5):774-9.

Campbell PT, Curtin K, Ulrich CM, Samowitz WS, Bigler J, Velicer CM, *et al.* Mismatch repair polymorphisms and risk of colon cancer, tumour microsatellite instability and interactions with lifestyle factors. *Gut*. 2009 May;58(5):661-7.

Case AS, Zigelboim I, Mutch DG, Babb SA, Schmidt AP, Whelan AJ, *et al.* Clustering of Lynch syndrome malignancies with no evidence for a role of DNA mismatch repair. *Gynecologic Oncology*, vol. 108, p.438-444, 2008.

Chadwick RB, Pyatt RE, Niemann TH, Richards SK, Johnson CK, Stevens MW, *et al.* Hereditary and somatic DNA mismatch repair gene mutations in sporadic endometrial carcinoma. *J Med Genet.* 2001 Jul;38(7):461-6.

Chan TL, Chan YW, Ho JW, Chan C, Chan AS, Chan E, *et al.* *MSH2* c. 1452–1455delAATG is a founder mutation and an important cause of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer in the southern Chinese population. *Am J Hum Genet.* 2004;74:1035–1042.

Chan TL, Yuen ST, Chung LP, Ho JW, Kwan KY, Chan AS, *et al.* Frequent microsatellite instability and mismatch repair gene mutations in young Chinese patients with colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1999 Jul 21;91(14):1221-6.

Chen H, Taylor NP, Sotamaa KM, Mutch DG, Powell MA, Schmidt AP, *et al.* Evidence for heritable predisposition to epigenetic silencing of *MLH1*. *Int J Cancer.* 2007 Apr 15;120(8):1684-8.

COSMIC. Catalogue of somatic mutations in cancer. Disponível em <http://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/mutation/overview?id=25911>. Acesso em 18 março 2013.

Cotti GCC, Santos FPS, Sebastianes FM, Habr-Gama A, Seid VE de Martino RB. *Rev Med (São Paulo)* 2000 abr./dez.;79(2/4):45-64.

Cristofaro G, Lynch HT, Caruso ML, Attolini A, DiMatteo G, Giorgio P, *et al.* New phenotypic aspects in a family with Lynch syndrome-II. *Cancer*, vol. 60, p.51-58, 1987.

De Jong AE, van Puijenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, *et al.* Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional *PMS2* staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* Feb 1;10(3):972-80, 2004.

De la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Familial Cancer*, vol. 4, p.233-237, 2005.

De Waziers I, Cugnenc PH, Berger A, Leroux JP, Beaune PH. Drug metabolizing enzyme expression in human normal, peritumoral and tumoral colorectal tissue samples. *Carcinogenesis*, 12(5): 905-9, 1991.

Doherty JA, Sakoda LC, Loomis MM, Barnett MJ, Julianto L, Thornquist MD, *et al.* DNA repair genotype and lung cancer risk in the beta-carotene and retinol efficacy trial. *Int J Mol Epidemiol Genet.* 2013;4(1):11-34.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an *HMSH2*-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science*, vol. 268, p.1909-1912, 1995.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, *et al.* Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Human Molecular Genetics*, vol. 6, p. 105-110, 1997.

English DR, MacInnis RJ, Hodge AM, Hopper JL, Haydon AM, Giles GG. Red meat, chicken and fish consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 13(9): 1509-14, 2004.

Fearnhead NS, Wilding JL, Bodmer WF. Genetics of colorectal cancer: Hereditary aspects and overview of colorectal tumorigenesis. *British Medical Bulletin*, vol. 64, p.27-43, 2002.

Ferreira CG e Rocha JC. Câncer Colorretal. In: Ferreira CG e Rocha JC. *Oncologia Molecular*. São Paulo, Atheneu, 2004. p. 171-81.

Fielding PP. Staging Systems. In: Cohen, A.M.; Winawer, SJ, Friedman MA, Gunderson LL. *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus*. New York, McGraw-Hill, 1995. p. 207-215.

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

Fitzgibbons RJ Jr, Lynch HT, Stanislav GV, Watson PA, Lanspa SJ, Marcus JN, *et al.* Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Annals of Surgery*, vol. 206, p.289-295, 1987.

Friedberg EC, Walker GC, Siede W. *DNA repair and mutagenesis*. Washington: ASM Press; 1995.

Giovannucci, E. Epidemiologic studies of folate and colorectal neoplasia: a review. *J Nutr*, 132(8): 2350-5, 2002.

Goecke T, Schulmann K, Engel C, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Schackert HK, *et al.* Genotype phenotype comparison of German *MLH1* and *MSH2* mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: A report by the German HNPCC consortium. *Journal of Clinical Oncology*, vol. 24, p.4285-4292, 2006.

Gorlov IP, Gorlova OY, Sunyaev SR, Spitz MR, Amos CI. Shifting paradigm of association studies: value of rare single-nucleotide polymorphisms. *Am J Hum Genet.* 2008 Jan;82(1):100-12.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DJ, *et al.* Colon and Rectum. In: Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DJ, Morrow M. *Cancer Staging manual.* Chicago, Springer, 2002.

Guillem JG, Paty PB, Rosen N. Molecular biology of colorectal cancer. In: Guillem, JG, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL. *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill, 1995. p. 149-56.

Han HJ, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair gene, *hMLH1*, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum. Molec. Genet.* 4: 237-242, 1995. Note: Erratum: *Hum. Molec. Genet.* 9: 321 only, 2000.

Han HJ, Yuan Y, Ku JL, Oh JH, Won YJ, Kang KJ, *et al.* Germline mutations of *hMLH1* and *hMSH2* genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1996 Sep 18;88(18):1317-9.

Harden DG. Inherited susceptibility to mutation. In: Phillips DH. *Environmental Mutagenesis.* Oxford, Bios. Scientific., 1995. p. 61-81.

Harley I, Rosen B, Risch HA, Siminovitch K, Beiner ME, McLaughlin J, *et al.* Ovarian cancer risk is associated with a common variant in the promoter sequence of the mismatch repair gene *MLH1*. *Gynecol Oncol.* 2008 Jun;109(3):384-7.

Hendriks Y, Franken P, Dierssen JW, De Leeuw W, Wijnen J, Dreef E, *et al.* Conventional and tissue microarray immunohistochemical expression analysis of mismatch repair in hereditary colorectal tumors. *Am J Pathol.* 2003 Feb;162(2):469-77.

Hendriks YM, de Jong AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, *et al.* Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): A guide for clinicians. *CA: a Cancer Journal for Clinicians*, vol. 56, p.213-225, 2006.

Hill MJ, Morson BC, Bussey HJ. Aetiology of adenoma-carcinoma sequence in large-bowel. *Lancet* 1978;1:245-7.

Hillman RS, Steinberg SE. The effects of alcohol on folate metabolism. *Ann Rev Med*, 33: 345-54, 1982.

Hoejmakers JH. Nucleotide excision repair I: from E. coli to yeast. *Trends Genet* 1993a;9:173-77.

Hoejmakers JH. Nucleotide excision repair II: from yeast to mammals. *Trends Genet* 1993b;9:211-7.

Houlston RS, Peto J. Genetics of common cancer. In: Eeles RA, Ponder B, Easton DE, Horwich A. *Inherited Predisposition to Cancer*. London, Chapman Hall Medical, 1996. p. 208-26.

Houlston RS, Webb E, Broderick P, Pittman AM, Di Bernardo MC, Lubbe S, *et al.* Meta-analysis of genome-wide association data identifies four new susceptibility loci for colorectal cancer. *Nat Genet*. 2008 Dec;40(12):1426-35.

Hutter P, Couturier A, Scott RJ, Alday P, Delozier-Blanchet C, Cachat F, *et al.* Complex genetic predisposition to cancer in an extended HNPCC family with an ancestral *hMLH1* mutation. *J Med Genet*. 1996;33:636-640.

INCA- Instituto Nacional de Câncer. Estimativas para incidência e mortalidade por câncer 2012. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em <http://www.inca.gov.br> . Acesso em 24 março 2013.

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

Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, *et al.* A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene *hMLH1*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 256: 488-494

Järvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*, vol. 108, p.1405-1411, 1995.

Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. *Cancer Statistics, 2007*. *CA Cancer J Clin.*, 57: 43-66, 2007.

Kim JC, Roh SA, Koo KH, Ka IH, Kim HC, Yu CS, *et al.* Genotyping possible polymorphic variants of human mismatch repair genes in healthy Korean individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Fam Cancer*. 2004;3(2):129-37.

Knekt P, Hakama M, Järvinen R, Pukkala E, Heliövaara M. Smoking and risk of colorectal cancer. *Br J Haematol*, 78(1): 136-139, 1998.

Koehler U, Grabowski M, Bacher U, Holinski-Feder E. A new interphase fluorescence in situ hybridization approach for genomic rearrangements involving *MLH1* and *MSH6* in hereditary nonpolyposis colorectal cancer-suspected mutation-negative patients. *Cancer Genet Cytogenet.* 2007 May;175(1):81-4.

Kohonen-Corish M, Ross VL, Doe WF, Kool DA, Edkins E, Faragher I, *et al.* RNA-based mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Hum Genet.* 1996 Oct;59(4):818-24.

Kolodner RD, Hall NR, Lipford J, Kane MF, Rao MRS, Morrison P, *et al.* Structure of the human *MSH2* locus and analysis of two Muir-Torre kindreds for *MSH2* mutations. *Genomics* 24: 516-526, 1994.

Kolodner RD. Mismatch repair: Mechanism and relationship to cancer susceptibility. *TIBS* 1995;20:397-401.

Kornberg A, Baker TA. DNA replication. 2nd ed. New York: W.H. Freeman; 1992.

Krajinovic M, Labuda D, Mathonnet G, Labuda M, Moghrabi A, Champagne J, *et al.* Polymorphisms in genes encoding drugs and xenobiotic metabolizing enzymes, DNA repair enzymes, and response to treatment of childhood acute lymphoblastic leukemia. *Clin Cancer Res.* 2002 Mar;8(3):802-10.

Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, *et al.* Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Feb 21;99(4):291-9.

Landi S, Gemignani F, Canzian F, Gaborieau V, Barale R, Landi D, *et al.* DNA repair and cell cycle control genes and the risk of young-onset lung cancer. *Cancer Res.* 2006 Nov 15;66(22):11062-9.

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

Leach FS, Koh M, Sharma K, McWilliams G, Talifero-Smith L, Codd A, *et al.* Mismatch repair gene mutations in renal cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2002 Sep-Oct;1(5):530-6.

Lee KM, Choi JY, Kang C, Kang CP, Park SK, Cho H, *et al.* Genetic polymorphisms of selected DNA repair genes, estrogen and progesterone receptor status, and breast cancer risk. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 15;11(12):4620-6.

Lin X, Choi JH, Lynch P, Xi L, Wu E, Frazier ML. Reduction in h*MSH2* mRNA levels by premature translation termination: implications for mutation screening in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Dig Dis Sci.* 1999 Mar;44(3):553-9.

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

Lipkin SM, Rozek LS, Rennert G, Yang W, Chen PC, Hacia J, *et al.* The *MLH1* D132H variant is associated with susceptibility to sporadic colorectal cancer. *Nat Genet*. 2004;36:694–699.

Liu HX, Zhou XL, Liu T, Werelius B, Lindmark G, Dahl N, *et al.* The role of hMLH3 in familial colorectal cancer. *Cancer Res*. 2003 Apr 15;63(8):1894-9.

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

Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Overview of natural history, molecular and genetics and management of HNPCC (Lynch syndrome). *Int J Cancer* 1996;69:38-43.

Lynch HT, Ens J, Lynch JF, Watson P. Tumor variation in three extended Lynch syndrome II kindreds. *American Journal of Gastroenterology*, vol. 83, p.741-747, 1988.

Lynch JF e Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). Na updated review. *Cancer*, vol. 78, p.1149-1167, 1996.

Lynch JF, Shaw TG, Lynch JF, Grady WM. Histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose. *In: Câncer de cólon, reto e ânus*. Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Jr S, Lopes A. (editores). São Paulo: Lemar/Tecmedd, 2005.

Lynch PM. New issues in genetic counseling of hereditary colon cancer. *Clin Cancer Res*. 2007 Nov 15;13(22 Pt 2):6857s-61s.

Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 99, p.261-263, 2007.

Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Mathiak M, Buettner R, Engel C, *et al.* Spectrum and frequencies of mutations in *MSH2* and *MLH1* identified in 1,721 German families suspected of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Int J Cancer*. 2005 Sep 20;116(5):692-702.

Mangold E, Pagenstecher C, Friedl W, Fischer HP, Merkelbach-Bruse S, Ohlendorf M, *et al.* Tumours from *MSH2* mutation carriers show loss of *MSH2* expression but many tumours from *MLH1* mutation carriers exhibit weak positive *MLH1* staining. *J Pathol*. 2005 Dec;207(4):385-95.

- Marra G, Boland CR. DNA repair and colorectal cancer. *Gastroenterol Clin North Am* 1996;25:755-72.
- Mei M, Liu D, Dong S, Ingvarsson S, Goodfellow PJ, Chen H. The *MLH1* -93 promoter variant influences gene expression. *Cancer Epidemiol*. 2010 Feb;34(1):93-5.
- Mei Q, Yan HL, Ding FX, Xue G, Huang JJ, Wang YZ, *et al*. Single-nucleotide polymorphisms of mismatch repair genes in healthy Chinese individuals and sporadic colorectal cancer patients. *Cancer Genet Cytogenet*. 2006 Nov;171(1):17-23.
- Mizoue T, Tanaka K, Tsuji I, Wakai K, Nagata C, Otani T, *et al*. Alcohol drinking and colorectal cancer risk: an evaluation based on a systematic review of epidemiologic evidence among the Japanese population. *Jpn J Clin Oncol*, 36(9):582-97, 2006.
- Moisio AL, Sistonen P, Weissenbach J, de la Chapelle A, Peltomäki P. Age and origin of two common *MLH1* mutations predisposing to hereditary colon cancer. *Am J Hum Genet*. 1996;59:1243-1251.
- 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.
- Namba H, Matsuo K, Fagin JA. Clonal composition of benign and malignant thyroid tumors. *J Clin Invest*, 86(1): 120-5, 1990.
- NCBI. Variante c.646A>G (rs63749936). Disponível em http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=63749936. Acesso em 22 de abril de 2013.
- Nejda N, Iglesias D, Moreno Azcoita M, Medina Arana V, González-Aguilera JJ, Fernández-Peralta AM. A *MLH1* polymorphism that increases cancer risk is associated with better outcome in sporadic colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2009 Sep;193(2):71-7.
- Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
- Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, Krarup HB, Orntoft TF, Nielsen FC, *et al*. Major contribution from recurrent alterations and *MSH6* mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam Cancer*. 2009;8(1):75-83.

- Nyström-Lahti M, Kristo P, Nicolaides NC, Chang SY, Aaltonen LA, Moisio AL, *et al.* Founding mutations and Alu-mediated recombination in hereditary colon cancer. *Nat Med.* 1995;1:1203–1206.
- Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, *et al.* GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science*, vol. 268, p.1912-1914, 1995.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, *et al.* Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
- Papp J, Kovacs ME, Olah E. Germline *MLH1* and *MSH2* mutational spectrum including frequent large genomic aberrations in Hungarian hereditary non-polyposis colorectal cancer families: implications for genetic testing. *World J Gastroenterol.* 2007 May 21;13(19):2727-32.
- Park SH, Lee GY, Jeon HS, Lee SJ, Kim KM, Jang SS, *et al.* -93G-->A polymorphism of h*MLH1* and risk of primary lung cancer. *Int J Cancer.* 2004 Nov 20;112(4):678-82.
- Peinado MA, Malkhosyan S, Velazquez A, Perucho M. Isolation and characterization of allelic losses and gains in colorectal tumors by arbitrarily primed polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10065-9.
- Peltomaki P. Lynch syndrome genes. *Familial Cancer*, vol. 4, p.227-232, 2005.
- Perucho M, Peinado MA, Ionov Y, Casares S, Malkhosyan S, Stanbridge E. Defects in replication fidelity of simple repeated sequences reveal a new mutator mechanism for oncogenesis. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1994;59:339-48.
- Peters RK, Garabrant DH, Yu MC, Mack TM. A case-control study of occupational and dietary factors in colorectal cancer in young men by subsite. *Cancer Res*, 49: 5459-68, 1989.
- Planck M, Koul A, Fernebro E, Borg A, Kristoffersson U, Olsson H, *et al.* h*MLH1*, h*MSH2* and h*MSH6* mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from southern Sweden. *Int J Cancer.* 1999 Oct 8;83(2):197-202.
- Ponz de Leon M, Benatti P, Di Gregorio C, Pedroni M, Losi L, Genuardi M, *et al.* Genetic testing among high-risk individuals in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2004 Feb 23;90(4):882-7.
- Pritchard JK, Cox NJ. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet.* 2002 Oct 1;11(20):2417-23.
- Raevaara TE, Korhonen MK, Lohi H, Hampel H, Lynch E, Lönnqvist KE, *et al.* Functional significance and clinical phenotype of nontruncating mismatch repair variants of *MLH1*. *Gastroenterology.* 2005 Aug;129(2):537-49.

Raptis S, Mrkonjic M, Green RC, Pethe VV, Monga N, Chan YM, *et al.* *MLH1* - 93G>A promoter polymorphism and the risk of microsatellite-unstable colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2007 Mar 21;99(6):463-74.

Reenan RA, Kolodner RD. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics* 1992a;132:963-73

Reenan RA, Kolodner RD: Characterization of insertion mutations in the *Saccharomyces cerevisiae* MSH1 and *MSH2* genes: evidence for separate mitochondrial and nuclear functions. *Genetics* 1992a;132:975.

Robbins SL, Cotran RS, Kumar V. *Pathologic basis of disease*. 6th ed. Philadelphia: W.B. Saunders; 1998.

Rodríguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, Myrhøj T, Rozen P, Bertario L, *et al.* Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International collaborative group on HNPCC. *Annals of Surgery*, vol. 225, p.202-207, 1997.

Rossi BM e Pinho M. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar, 1999.

Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, Epelman C, Paegle LD, Nakagawa WT, *et al.* Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *South Am J Cancer*, vol. 1, p. 191- 197, 1997.

Rossi BM, Nakagawa TW, Ferreira OF, Aguiar S, Lopes A. Epidemiologia e fatores de risco em Câncer Colorretal. In : Rossi BM, Nakagawa TW, Ferreira OF, Aguiar S, Lopes A. *Câncer de Cólon, Reto e Ânus*. São Paulo, Lemar, 2004. p. 03-21

Rossi BM, Pinho MSL, Nakagawa WT, Johnson LFP, Lopes A. Tumores colorretais hereditários. *Rev Col Bras Cir* 1998;25(4):271-80.

Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, *et al.* *hMLH1* and *hMSH2* gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2002 Jul;9(6):555-61.

Sachse C, Smith G, Wilkie MJV, Barret JH, Waxman R, Sullivan F, *et al.* Colorectal Cancer Study Group. A pharmacogenetic study to investigate the role of dietary carcinogens in the etiology of colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 23(11): 1839-49, 2002.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullins KB, Horn GT, Erlich HA, *et al.* Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replication of short synthetic DNA's as catalysed by polymerases. *J Mol Biol.* 1971; 56: 341- 346.

Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kääriäinen H, Ahtola H, Eskelinen M, *et al.* Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2000;18:2193–2200.

Sancar AZ e Sancar GB. DNA repair enzymes. *Annu Rev Biochem* 1988;57:29-67.

Santibanez Koref M, Wilson V, Cartwright N, Cunnington MS, Mathers JC, Bishop DT, *et al.* *MLH1* Differential allelic expression in mutation carriers and controls. *Ann Hum Genet.* 2010 Nov;74(6):479-88.

Sasieni PD. From genotypes to genes: doubling the sample size. *Biometrics* 1997;53:1253–61.

Satia-Abouta J, Galanko JA, Martin CF, Ammerman A, Sandler RS. Food groups and colon cancer risk in African-Americans and Caucasians. *Int J Cancer,* 109(5): 728-36, 2004.

Schottenfeld, D. Epidemiology. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL. *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill, 1995. p. 11-24.

Shen XS, Zhao B, Wang ZJ. Clinical features and *hMSH2/hMLH1* germ-line mutations in Chinese patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Chin Med J (Engl).* 2008 Jul 20;121(14):1265-8.

Shike M. Dietary Factors. In: Cohen AM, Winawer SJ, Friedman MA, Gunderson LL. *Cancer of the Colon, Rectum, and Anus.* New York, McGraw-Hill, 1995. p. 5-40.

Silva FC, Valentin MD, Ferreira Fde O, Carraro DM, Rossi BM. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. *Sao Paulo Med J.* 2009 Jan;127(1):46-51.

Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, Bigler J, Caan B, Leppert M. NAT2, GSTM-1, cigarette smoking, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev,* 7(12): 1079-84, 1998.

Spaepen M, Vankeirsbilck B, Van Opstal S, Tejpar S, Van Cutsem E, Geboes K, *et al.* Germline mutations of the *hMLH1* and *hMSH2* mismatch repair genes in Belgian hereditary nonpolyposis coloncancer (HNPCC) patients. *Fam Cancer.* 2006;5(2):179-89.

Spirio L, Green J, Robertson J, Robertson M, Otterud B, Sheldon J, *et al.* The identical 5' splice-site acceptor mutation in five attenuated APC families from Newfoundland demonstrates a founder effect. *Hum Genet.* 1999;105:388 –398.

Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, *et al.* Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer: implications for clinical predisposition testing. *JAMA*. 1999 Jul 21;282(3):247-53.

Takahashi M, Shimodaira H, Andreutti-Zaugg C, Iggo R, Kolodner RD, Ishioka C. Functional analysis of human *MLH1* variants using yeast and in vitro mismatch repair assays. *Cancer Res*. 2007 May 15;67(10):4595-604.

Terdiman JP, Gum JR Jr, Conrad PG, Miller GA, Weinberg V, Crawley SC, *et al.* Efficient detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer gene carriers by screening for tumor microsatellite instability before germline genetic testing. *Gastroenterology*. 2001 Jan;120(1):21-30.

Tournier I, Vezain M, Martins A, Charbonnier F, Baert-Desurmont S, Olschwang S, *et al.* A large fraction of unclassified variants of the mismatch repair genes *MLH1* and *MSH2* is associated with splicing defects. *Hum Mutat*. 2008 Dec;29(12):1412-24.

Trojan J, Zeuzem S, Randolph A, Hemmerle C, Brieger A, Raedle J, *et al.* Functional analysis of h*MLH1* variants and HNPCC-related mutations using a human expression system. *Gastroenterology*. 2002 Jan;122(1):211-9.

Turner F, Smith G, Sachse C, Lightfoot T, Garner RC, Wolf CR, Vegetable, fruit and meat consumption and potential risk modifying genes in relation to colorectal cancer. *Int J Cancer*, 112(2): 259-64, 2004.

Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, *et al.* Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 96, p.261-268, 2004.

Valentin MD, da Silva FC, dos Santos EM, Lisboa BG, de Oliveira LP, Ferreira Fde O, *et al.* Characterization of germline mutations of *MLH1* and *MSH2* in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. *Fam Cancer*. 2011 Dec;10(4):641-7.

Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Diseases of the Colon and Rectum*, vol. 34, p.424-425, 1991.

Vasen HF, Offerhaus GJ, den Hartog Jager FC, Menko FH, Nagengast FM, Griffioen G, *et al.* The tumour spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer: A study of 24 kindreds in the Netherlands. *International Journal of Cancer*, vol. 46, p.31-34, 1990.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology*, vol. 116, p.1453-1456, 1999.

Vasen HF. Clinical description of the Lynch syndrome hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Familial Cancer*, vol. 4, p.219-225, 2005.

Wagner A, Barrows A, Wijnen JT, van der Klift H, Franken PF, Verkuijlen P, *et al.* Molecular analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the United States: high mutation detection rate among clinically selected families and characterization of an American founder genomic deletion of the *MSH2* gene. *Am J Hum Genet.* 2003 May;72(5):1088-100.

Wahlberg S, Liu T, Lindblom P, Lindblom A. Various mutation screening techniques in the DNA mismatch repair genes *hMSH2* and *hMLH1*. *Genet Test.* 1999;3(3):259-64.

Wang J, Luo MH, Zhang ZX, Zhang PD, Jiang XL, Ma DW, *et al.* Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. *World Journal of Gastroenterology*, vol. 13, p. 1612-1617, 2007.

Wayer J. Evolução do câncer do cólon. In: Habr-Gama A, Gama-Rodrigues JJ, Betarello A. Câncer do Estômago e do Intestino Grosso: Prevenção e Detecção. São Paulo, Editora Pedagógica e Universitária Ltda. 1980. p. 73-76.

Wevrick R, Buchwald M. Mammalian DNA-repair genes. *Curr Opin Genet Dev* 1993;3:470-4.

Whiffin, N., Broderick, P., Lubbe, S. J., Pittman, A. M., Penegar, S., Chandler, I. and Houlston, R. S. (2011) *MLH1*-93G . A is a risk factor for MSI colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 32, 1157–1161.

Willis RA. The spread of tumors in the human body. 3rd ed. London: Butterworth; 1952.

Winawer SJ, Enker WE, Lightdale CJ. Malignant tumors of the colon and rectum. In: Berk JE. *Gastroenterology*. Philadelphia, W.B. Saunders Company, 1985, p. 2531-2574.

Woodhead JL, Fallon R, Figuered H, Longdale J, Malcon ADB. Alternative methodology of gene diagnosis. In: Daves KE. *Human genetic disease-a practical approach*. Oxford.: IRL Press Limited, 1986, pp51- 64.

Yan HL, Hao LQ, Jin HY, Xing QH, Xue G, Mei Q, *et al.* Clinical features and mismatch repair genes analyses of Chinese suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer: a cost-effective screening strategy proposal. *Cancer Sci.* 2008 Apr;99(4):770-80.

Yu JH, Bigler J, Whitton J, Potter JD, Ulrich CM. Mismatchrepair polymorphisms and colorectal polyps: *hMLH1*-93G>A variant modifies risk associated withsmoking. *Am J Gastroenterol.* 2006 Jun;101(6):1313-9.

Zahary MN, Kaur G, Abu Hassan MR, Singh H, Naik VR, Ankathil R.
Germline mutation analysis of *MLH1* and *MSH2* in Malaysian Lynch syndrome patients.
World J Gastroenterol. 2012 Feb 28;18(8):814-20.

Zhao Y, Miyashita K, Ando T, Kakeji Y, Yamanaka T, Taguchi K, *et al.* Exclusive
KRAS mutation in microsatellite-unstable human colorectal carcinomas with sequence
alterations in the DNA mismatch repair gene, *MLH1*. Gene. 2008 Nov 1;423(2):188-93.

Zhou XL, Djureinovic T, Werelius B, Lindmark G, Sun XF, Lindblom A, *et al.* Germline
mutations in the MYH gene in Swedish familial and sporadic colorectal cancer. Genet
Test. 2005 Summer;9(2):147-51.

Zhou XL, Eriksson U, Werelius B, Kressner U, Sun XF, Lindblom A.
Definition of candidate low risk APC alleles in a Swedish population. Int J Cancer. 2004
Jul 1;110(4):550-7.

8. *ANEXOS*



CEP, 27/11/07.
(Grupo III)

PARECER CEP: N° 866/2007 (Este n° deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0622.0.146.000-07

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES NOS GENES hMLH1 e hMSH2 EM FAMÍLIAS QUE APRESENTAM CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE (HNPCC)”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carmen Silvia Bertuzzo/Lidiane Camila Rueda

INSTITUIÇÃO: Hospital das Clínicas/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 09/11/2007

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 27/11/08 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

Investigar a presença de mutações nos genes hMLH1 e hMSH2 em 40 famílias com câncer colorretal hereditário sem polipose. Relacionar com o grau histológico, sexo, idade etnia e apresentação clínica da doença.

III - SUMÁRIO

Serão estudadas 40 famílias com HNPCC em seguimento no ambulatório de oncogenética do HC-UNICAMP, para determinação das mutações em amostras de sangue periférico por análise de DNA genômico, PCR, triagem mutacional por dHPLC e seqüenciamento automático. Critérios de inclusão e exclusão bem definidos.

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Protocolo adequado. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido explica que o material poderá ficar guardado, caso o sujeito de pesquisa autorize e que o mesmo poderá ser utilizado em outras pesquisas após aprovação do CEP. Projeto com orçamento a ser solicitado à Fapesp.

Recomendamos revisão do orçamento com detalhamento (dólar/real).

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa supracitada.



O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

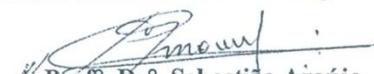
O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na XI Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 27 de novembro de 2.007.


Prof. Dr. Sebastião Araújo
VICE-PRESIDENTE DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP



Universidade Estadual de Campinas
 Departamento de Genética Médica

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Título do projeto: *Investigação de mutações nos genes hMLH1 e hMSH2 em famílias que apresentam Câncer de Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC)*

Nome do paciente:

HC: Data de nascimento: ____/____/____

Responsável: RG:

Aceito a participar do estudo proposto, no qual fornecerei uma amostra de sangue (volume 16 ml) a ser colhida em veia de um dos braços. Estou ciente de que este sangue será utilizado para a avaliação de uma predisposição familiar para o desenvolvimento de câncer do intestino e reto. Sei que posso sentir dor de pequena intensidade e pequena duração no local da punção da veia. Estou ciente de que não terei outros prejuízos com a realização deste exame. Qualquer outro estudo que utilize esse material, primeiro deverá ser a provado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP e na Comissão de Ética em Pesquisa.

Sei que posso sair do estudo a qualquer momento e que isto não prejudicará meu tratamento na UNICAMP. Sei ainda, que meus dados pessoais serão mantidos em sigilo pelo pesquisador. Se tiver qualquer dúvida sobre o estudo poderei procurar a Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo no departamento de Genética Médica – UNICAMP ou pelo telefone (19) 3521.8902.

Eu li/ouvi o conteúdo deste termo e recebi esclarecimentos sobre as minhas dúvidas oralmente.

Guardar o material: SIM () NÃO ()

Gostaria de ser avisado por carta ou telefone sobre o resultado da pesquisa: SIM () NÃO ()

Contato:

.....

.....

.....
 Paciente ou responsável

.....
 Pesquisador responsável
 Lidiane Camila Rueda

Campinas, ____/____/____.

