



**DANILO VILELA VIANA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CLÍNICA DOS  
QUADROS COM MUTAÇÕES BIALÉLICAS  
NOS GENES MMR**

**CAMPINAS**

**2013**

*i*





**Universidade Estadual de Campinas**  
**Faculdade de Ciências Médicas**

**DANILO VILELA VIANA**

**CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CLÍNICA DOS  
QUADROS COM MUTAÇÕES BIALÉLICAS  
NOS GENES MMR**

**Orientadora: Profa. Dra. Carmen Silvia Bertuzzo**

Tese de Doutorado apresentada à Comissão de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas, área de concentração em Genética Médica

Este exemplar corresponde à versão final da tese de doutorado defendida pelo aluno **DANILO VILELA VIANA** e orientado pela **PROFA. DRA. CARMEN SILVIA BERTUZZO**

---

Assinatura da Orientadora

**CAMPINAS**

**2013**

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas  
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

V654c Viana, Danilo Vilela, 1975-  
Caracterização genético-clínica dos quadros com mutações bialélicas nos genes MMR / Danilo Vilela Viana. – Campinas, SP : [s.n.], 2013.

Orientador: Carmen Silvia Bertuzzo.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Síndromes neoplásicas hereditárias. 2. Reparo de erro de pareamento de DNA. 3. Neoplasias encefálicas. 4. Genética. 5. Deficiência de reparo de erro de pareamento. I. Bertuzzo, Carmen Silvia. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Médicas. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

**Título em outro idioma:** Clinical characterization of biallelic mutations in MMR genes

**Palavras-chave em inglês:**

Hereditary neoplastic syndromes

DNA mismatch repair

Brain neoplasms

Genetics

Mismatch repair deficiency

**Área de concentração:** Genética Médica

**Titulação:** Doutor em Ciências Médicas

**Banca examinadora:**

Carmen Silvia Bertuzzo [Orientador]

Camila Andréa de Oliveira

Marilda de Souza Gonçalves

Antonia Paula Marques de Faria

Carlos Eduardo Steiner

**Data de defesa:** 29-08-2013

**Programa de Pós-Graduação:** Ciências Médicas

---

# BANCA EXAMINADORA DA DEFESA DE DOUTORADO

DANILO VILELA VIANA

---

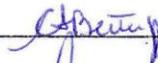
Orientador (a) PROF(A). DR(A). CARMEN SILVIA BERTUZZO

---

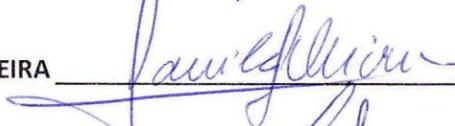
---

## MEMBROS:

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



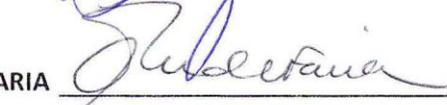
2. PROF(A). DR(A). CAMILA ANDRÉA DE OLIVEIRA



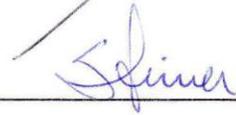
3. PROF(A). DR(A). MARILDA DE SOUZA GONÇALVES



4. PROF(A).DR(A). ANTONIA PAULA MARQUES DE FARIA



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



---

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

---

Data: 29 de agosto de 2013

---



A meus pais,  
este trabalho também é fruto do seu esforço.



## AGRADECIMENTOS

---

Em uma palavra: gratidão. Essa palavra representa a dádiva e a dívida. E não há absolutamente nada que eu possa fazer para retribuir aquilo que gratuitamente recebi o que me torna um devedor, para sempre, de todos aqueles que me estenderam a mão ou me abriram o coração; que acenaram um gesto de compreensão, ou me deram uma palavra de incentivo.

Existe um livro, que confesso nunca ter lido, mas cujo título é muito sugestivo, chamado “A Construção Amorosa do Saber”. Não existe pedagogia superior a essa. Essa foi a maior lição que aprendi nesta Universidade, desde a residência médica. E talvez a única maneira de pagar essa dívida seja dar a outros aquilo que eu recebi, então, essa é uma lição que procuro empregar em minha vida, como pessoa, como médico e como professor.

Seria impossível citar nominalmente todos a quem devo, mas, aqui, gostaria de agradecer:

A Deus, pela graça do impossível.

A meu pai (médico - exemplo de conduta) e minha mãe (educadora nata), pelo incentivo e amor, primeiros a me ensinar a pedagogia maior.

A meus irmãos, pela amizade e companheirismo.

À Dra. Carmen Sílvia Bertuzzo, minha orientadora, por toda compreensão e por todo o apoio e incentivo. Se eu tivesse de resumi-la em uma palavra, eu diria generosidade. Muito obrigado.

À Dra. Antonia Paula Marques de Faria, Dr. Carlos Eduardo Steiner, Dra. Denise Pontes Cavalcanti, Dra. Iscia Lopes-Cendes, Dra. Vera Lúcia Gil da Silva Lopes e demais docentes com quem convivi no Departamento de



Genética Médica. Por meio de vocês agradeço também todos os numerosos outros professores que tive ao longo de minha vida: vocês são exemplos e lições que levo comigo. Muito obrigado.

A Sra. Maria Cláudia Furlan Hudorovic e a Sra. Rosana Eugênia Soares Elias Lugli, funcionárias do Departamento de Genética Médica, e à Marcinha, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, pelas tantas vezes em que prontamente me ajudaram a resolver os problemas administrativos.

O Sr. Henrique Prata, dirigente da Fundação Pio XII, mantenedora do Hospital de Câncer de Barretos, pela coragem de ser pioneiro na área de oncogenética, oferecendo testes genéticos gratuitamente no âmbito do Sistema Único de Saúde, iniciativa sem a qual não seria possível a presente pesquisa.

O Sr. Edmundo Mauad, diretor-geral do Hospital de Câncer de Barretos e chefe do Departamento de Prevenção, no qual se insere a Oncogenética no Hospital de Câncer de Barretos, pelo irrestrito apoio às atividades desenvolvidas.

O Dr. Rui Manoel Reis, pesquisador do Hospital de Câncer de Barretos, colaborador e amigo, pelo auxílio sem o qual este trabalho não seria possível.

À Dra. Marta Viana-Pereira, da Universidade do Minho, Portugal, pela colaboração neste projeto.

Josiane Cristina de Lima, Orleide Sousa Marques, Rosemeire da Silva Zamboti de Mattos Barros e demais funcionárias do Departamento de Oncogenética do Hospital de Câncer de Barretos, pelo seu trabalho e dedicação, na área administrativa e nos ambulatórios, que tornou possível esta pesquisa.

O Dr. Cristovam Scapulatempo Neto, amigo de longa data, e todo o Departamento de Patologia do Hospital de Câncer de Barretos, pelo pronto auxílio na identificação, revisão e disponibilização do material usado na pesquisa.



O Dr. Luiz Fernando Lopes e toda a equipe da Oncologia Pediátrica do Hospital de Câncer de Barretos, pela receptividade e auxílio nos atendimentos realizados no Hospital Infantil.

A equipe da Neurocirurgia do Hospital de Câncer de Barretos, pela participação na assistência às famílias aqui estudadas.

A Dra. Edenir Palmero e toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital de Câncer de Barretos, pelas análises moleculares realizadas.

A Sra. Maria da Conceição Luiz Buquera, pela dedicação em ajudar-me nessa batalha vencida.

Caroline, por ter estado ao meu lado em grande parte desse caminho.

Augusto e Luciane, pessoas maravilhosas em minha vida, pela força que me deram.

A diversos outros amigos de quem sou devedor, em particular Heather, Jéssica, Karen, Paula e Stephen - pela mão amiga. Isso basta.

A todos vocês, muito obrigado.



“É o Senhor, teu Deus,  
que marcha adiante de ti,  
com um fogo devorador...a terra que ides conquistar  
é um país de montanhas e de vales,  
impregnado das chuvas do céu.”

***Deuterônimo***





# RESUMO



Há muito tempo reconhece-se a importância de fatores hereditários na oncogênese. Dentre os genes associados ao câncer, um importante grupo é formado por aqueles direta ou indiretamente relacionados ao reparo do DNA, entre os quais está um grupo de genes pertencentes ao sistema de reparo de erros de pareamento de bases do DNA (*mismatch repair* - MMR), do qual fazem parte *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e *hPMS2*. Quando mutações monoalélicas nesses genes são herdadas, elas são responsáveis pela síndrome de Lynch, que cursa com predisposição ao câncer de cólon e endométrio, entre outros, geralmente na terceira ou quarta década de vida. A ocorrência de câncer na infância ou de tumores hematológicos não é comum na síndrome de Lynch. Nos últimos anos, entretanto, foram relatados diversos casos de pacientes que, na primeira ou segunda década de vida, apresentam tumores de sistema nervoso central, gastrintestinais, hematológicos, alguns deles com manifestações cutâneas semelhantes à neurofibromatose tipo 1. Nesses pacientes, foram identificadas mutações bialélicas nos genes do sistema MMR. O presente estudo propôs-se a analisar os tecidos tumorais de uma série retrospectiva de pacientes de zero a 35 anos de idade (inclusive), com diagnóstico de câncer de sistema nervoso central, visando a identificação de pacientes com mutações bialélicas nos genes do sistema MMR e a caracterização de seu quadro clínico. Teve por objetivos específicos: identificar os casos com instabilidade de microssatélites (MSI); determinar a proporção de tumores instáveis e o genótipo para os genes do sistema MMR nos casos que foram instáveis; correlacionar as mutações encontradas com o fenótipo e história familiar. Um total de 79 pacientes foram incluídos no estudo. O diagnóstico era de glioma em 42 e meduloblastoma em 37. Inicialmente foi realizada a pesquisa de MSI nos tumores de todos os pacientes, seguido de avaliação clínica e coleta de sangue para pesquisa de mutações deletérias nos genes do sistema MMR, naqueles que apresentavam instabilidade. Foi encontrada baixa MSI (MSI-L) em sete casos de glioma e oito casos de meduloblastoma. Esses pacientes foram convocados para avaliação quanto à história clínica, exame físico e história familiar. Seis pacientes atenderam ao convite, foram avaliados e tiveram sequenciamento e pesquisa de deleções por

meio da técnica de MLPA realizados para os genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*. Não foram encontradas mutações deletérias em nenhum desses indivíduos. Procedeu-se, ainda, a determinação do intervalo de variação quase monomórfico para a população estudada, após o qual, cinco dos pacientes com diagnóstico de meduloblastoma, originalmente classificados como MSI-L, foram reclassificados como sendo estáveis (MSS). No presente estudo demonstrou-se que 8,3% dos pacientes com diagnóstico de meduloblastoma e 17,5% daqueles com gliomas possuíam MSI-L. A correlação do genótipo com o fenótipo e história familiar não pôde ser realizada, visto não terem sido encontradas mutações deletérias. Sugere-se que sejam realizados estudos adicionais, preferencialmente prospectivos, para estabelecer a frequência de mutações nos genes do sistema MMR em pacientes pediátricos e adultos jovens com tumores de sistema nervoso central e instabilidade de microssatélites, uma questão importante para o aconselhamento genético, e, possivelmente, para implantação de uma rotina de rastreamento com pesquisa de MSI nessa população de pacientes.



# **ABSTRACT**



Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant hereditary cancer predisposition disorder characterized by early onset of cancer (mean age, approximately 40-45 years), especially endometrium and/or colorectal cancer in the absence of gastrointestinal polyposis, and which, in addition, shows increased frequency of carcinomas of the ovary, small intestine, ureter, renal pelvis, stomach, among others. Its molecular hallmark is a type of genetic instability known as microsatellite instability (MSI) that affects short sequences of DNA repeats (microsatellites) found throughout the genome, leading to accumulation of genetic alterations. In LS, Cancer predisposition is due almost exclusively to heterozygous germline mutations in one of the DNA MMR genes (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, and *hMSH6*). Childhood cancers and hematological neoplasia generally do not belong to the Lynch tumour spectrum. However, over the past few years there have been reports of children that have presented with the constellation of early onset gastrointestinal cancers, along with features of neurofibromatosis type-1 and/or hematologic malignancies, and/or neurological tumors due to homozygous mutations in the mismatch repair genes. The present study analyzed a retrospective series of central nervous system tissue from patients with 0 to 35 years of age, with the aim to identify biallelic mutations in MMR genes and characterization of its clinical tumor spectrum. The aims of this study were to analyze: the frequency of microsatellite instability in tumors; the genotype and the frequency of germline mutations in MMR genes in patients who had MSI; its correlation to the phenotype and family history. A total of 42 gliomas and 37 medulloblastomas were analyzed. Initially, they were screened for microsatellite instability (MSI), followed by clinical evaluation, family history taking and sequence analysis of DNA obtained from blood lymphocytes. Low MSI (MSI-L) was found in seven gliomas and eight medulloblastomas. These patients were invited for clinical examination, family history taking and blood drawing. Six attended the clinical evaluation and had their sequence analysis done for *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6*. No deleterious mutations were found among these patients. In addition, the *quasi*-monomorphic variation range was determined for this population, a important step previously not investigated in Brazilian population, that showed

that with the proper values for the target population, 5 from the original MSI-L medulloblastomas were reclassified as stable (MSS). In conclusion, the present study showed that 8,3% of the medulloblastomas and 17,5% of gliomas had MSI-L. The correlation of the genotype with clinical characteristics and family history could not be done, as no deleterious mutations were found. It was suggested that new prospective studies are necessary to properly address the issue of the frequency of biallelic mutations in pediatric and young adults patients with MSI-L tumors of the CNS.

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>APC</b>	Gene ou proteína APC ( <i>adenomatous polyposis coli</i> )
<b>CCR</b>	Câncer de cólon e reto
<b>CCS</b>	<i>Childhood cancer syndrome</i> - síndrome do câncer infantil - sinônimo para a forma bialélica da síndrome de Lynch
<b>CEP</b>	Comitê de Ética em Pesquisa
<b>CID</b>	Classificação Internacional de Doenças
<b>CMMR-D</b>	<i>Constitutional MMR deficiency syndrome</i> - síndrome da deficiência constitucional de MMR - sinônimo para a forma bialélica da síndrome de Lynch
<b>CoLoN</b>	Acrônimo <b><u>C</u>olon tumours and/or <u>L</u>eukaemia/Lymphoma and/or <u>N</u>eurofibromatosis features</b> - sinônimo para a forma bialélica da síndrome de Lynch
<b>DP</b>	Desvio padrão
<b>EMAST</b>	<i>Elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats</i>
<b>EPCAM</b>	Gene <i>EPCAM</i> (gene que em publicações mais antigas era denominado <i>TACSTD1</i> )
<b>FAM</b>	Corante fluorescente 6-carboxi-fluoresceína
<b>HCB</b>	Hospital de Câncer de Barretos
<b>HEX</b>	Corante fluorescente hexacloro-6-carboxifluoresceína



<b>HF</b>	História familiar
<b><i>hMLH1</i></b>	Gene <i>hmlh1</i>
<b><i>hMSH2</i></b>	Gene <i>hmsh2</i>
<b><i>hMSH3</i></b>	Gene <i>hmsh3</i>
<b><i>hMSH6</i></b>	Gene <i>hmsh6</i>
<b>HNPCC</b>	Câncer colorretal sem polipose ( <i>hereditary non-polyposis colorectal cancer</i> )
<b><i>hPMS1</i></b>	Gene <i>hpms1</i>
<b><i>hPMS2</i></b>	Gene <i>hpms2</i>
<b>ICG-HNPCC</b>	<i>International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer</i> (deu origem ao insight)
<b>IHQ</b>	Imunohistoquímica
<b>InSiGHT</b>	<i>International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours</i>
<b>kb</b>	Quilobases
<b>LOVD</b>	<i>Leiden open variation database</i>
<b>MCL</b>	Manchas café-com-leite
<b>MMR</b>	Reparo de erros de pareamento ( <i>Mismatch repair</i> )
<b>MSI</b>	Instabilidade de microssatélite ( <i>Microsatellite instability</i> )
<b>MSI-H</b>	Instabilidade alta de microssatélites
<b>MSI-L</b>	Instabilidade baixa de microssatélites



<b>MSS</b>	Estabilidade de microssatélites ou microssatélite estável
<b>NCI</b>	<i>National Cancer Institute</i> dos EUA
<b>PAF</b>	Polipose adenomatosa familiar
<b>PAFA</b>	Polipose adenomatosa familiar atenuada
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PH</b>	Pólipos hiperplásicos
<b>PNET</b>	<i>Primitive neuroectodermal tumor</i> - tumor neuroectodérmico primitivo
<b>QMVR</b>	Intervalo de variação quase monomórfica ( <i>quasimonomorphic variation range</i> )
<b>RER</b>	<i>Replication errors</i> (fenótipo de erros e replicação – sinônimo de instabilidade de microssatélites)
<b>SL</b>	Síndrome de Lynch
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>SOE</b>	Sem outras especificações
<b>TET</b>	Corante fluorescente tetracloro-6-carboxifluoresceína
<b>TGFβR</b>	( <i>Transforming growth factor beta receptor</i> ) receptor do fator transformador de crescimento beta
<b>3UTR</b>	Região 3' não traduzida
<b>5UTR</b>	Região 5' não traduzida



## LISTA DE TABELAS

---

		Pág.
<b>Tabela 1</b>	Tumores do SNC em pacientes com mutações bialélicas.....	80
<b>Tabela 2</b>	Tumores hematológicos em pacientes com mutações bialélicas.....	80
<b>Tabela 3</b>	Tumores gastrintestinais em pacientes com mutações bialélicas.....	80
<b>Tabela 4</b>	Outros tumores em pacientes com mutações bialélicas.....	81
<b>Tabela 5</b>	Sequências inicializadoras ( <i>primers</i> ) na PCR multiplex para detecção de instabilidade de microssatélites.....	94
<b>Tabela 6</b>	Sequências inicializadoras ( <i>primers</i> ) para o gene <i>hMLH1</i> .....	98
<b>Tabela 7</b>	Sequências inicializadoras ( <i>primers</i> ) para o gene <i>hMSH2</i> .....	99
<b>Tabela 8</b>	Sequências inicializadoras ( <i>primers</i> ) para o gene <i>hMSH6</i> .....	100
<b>Tabela 9</b>	Proporção de meduloblastomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo.....	105
<b>Tabela 10</b>	Proporção de gliomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo.....	106
<b>Tabela 11</b>	Proporção de gliomas de baixo e de alto grau e sua idade média ao diagnóstico.....	106
<b>Tabela 12</b>	Pacientes com MSI no grupo dos gliomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo.....	107



<b>Tabela 13</b>	Pacientes com MSI no grupo dos meduloblastomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo.....	107
<b>Tabela 14</b>	Proporção de gliomas com MSI-L, divididos por faixa etária.....	108
<b>Tabela 15</b>	Proporção de gliomas com MSI-L, divididos por grau OMS.....	108
<b>Tabela 16</b>	Status de MSI para os pacientes com glioma.....	109
<b>Tabela 17</b>	Status de MSI para os pacientes com meduloblastoma.....	110
<b>Tabela 18</b>	Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para pacientes com status anormal.....	112
<b>Tabela 19</b>	Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para pacientes com status anormal e que foram avaliados.....	114
<b>Tabela 20</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para a paciente G6.....	120
<b>Tabela 21</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para a paciente G6.....	120
<b>Tabela 22</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para a paciente G6.....	120
<b>Tabela 23</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para o paciente G8.....	126
<b>Tabela 24</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para o paciente G8.....	127
<b>Tabela 25</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para o paciente G8.....	127
<b>Tabela 26</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para o paciente G22.....	131
<b>Tabela 27</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para o paciente G22.....	131
<b>Tabela 28</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para o paciente G22.....	131



<b>Tabela 29</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para o paciente G23.....	135
<b>Tabela 30</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para o paciente G23.....	135
<b>Tabela 31</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para o paciente G23.....	135
<b>Tabela 32</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para o paciente M12.....	138
<b>Tabela 33</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para o paciente M12.....	138
<b>Tabela 34</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para o paciente M12.....	138
<b>Tabela 35</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para o paciente M36.....	142
<b>Tabela 36</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para o paciente M36.....	142
<b>Tabela 37</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para o paciente M36.....	142
<b>Tabela 38</b>	Resumo das variantes encontradas.....	143
<b>Tabela 39</b>	Resumo das características dos pacientes que não participaram da avaliação clínica.....	144
<b>Tabela 40</b>	Tamanho dos alelos e QMVR para cada marcador.....	146
<b>Tabela 41</b>	Resultados da pesquisa de MSI, após QMVR.....	148
<b>Tabela 42</b>	Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para a paciente ES.....	155
<b>Tabela 43</b>	Genótipo do <i>hMLH1</i> para a paciente ES.....	155
<b>Tabela 44</b>	Genótipo do <i>hMSH2</i> para a paciente ES.....	155
<b>Tabela 45</b>	Genótipo do <i>hMSH6</i> para a paciente ES.....	155



## LISTA DE FIGURAS

---

		<b>Pág.</b>
<b>Figura 1</b>	Fluxograma diagnóstico na Síndrome de Lynch.....	71
<b>Figura 2</b>	Fluxograma das etapas do estudo.....	93
<b>Figura 3</b>	Exemplos de resultados da pesquisa de instabilidade de microssatélites (diferentes amostras de tumor).....	96
<b>Figura 4</b>	Heredograma G6.....	116
<b>Figura 5</b>	Exames de imagem da paciente G6.....	117
<b>Figura 6</b>	Mancha café-com-leite - paciente G6.....	118
<b>Figura 7</b>	Mancha café-com-leite - paciente G6.....	118
<b>Figura 8</b>	Mancha café-com-leite - paciente G6.....	119
<b>Figura 9</b>	<i>Nevus spilus</i> - paciente G6.....	119
<b>Figura 10</b>	Heredograma G8.....	123
<b>Figura 11</b>	Exames de imagem do paciente G8.....	124
<b>Figura 12</b>	Lesões de pele - paciente G8.....	125
<b>Figura 13</b>	Mancha café-com-leite - paciente G8.....	126
<b>Figura 14</b>	Heredograma G22.....	129
<b>Figura 15</b>	Exames de imagem do paciente G22.....	130



<b>Figura 16</b>	Heredograma G23.....	133
<b>Figura 17</b>	Exames de imagem do paciente G23.....	134
<b>Figura 18</b>	Heredograma M12.....	137
<b>Figura 19</b>	Heredograma M36.....	140
<b>Figura 20</b>	Exames de imagem do paciente M36.....	141
<b>Figura 21</b>	Heredograma paciente ES.....	150
<b>Figura 22</b>	Exames de imagem da paciente ES.....	151
<b>Figura 23</b>	Lesões de pele - paciente ES.....	152
<b>Figura 24</b>	Nevo pigmentado - paciente ES.....	152
<b>Figura 25</b>	<i>Nevus spilus</i> - paciente ES.....	153
<b>Figura 26</b>	Mancha café-com-leite - paciente ES.....	153
<b>Figura 27</b>	Mancha café-com-leite - paciente ES.....	154



## LISTA DE QUADROS

---

	<b>Pág.</b>
<b>Quadro 1</b> Localização e tamanho dos genes do sistema MMR.....	58
<b>Quadro 2</b> Componentes do sistema MMR.....	60
<b>Quadro 3</b> Critérios diagnósticos de Amsterdã I e II.....	63
<b>Quadro 4</b> Critérios diagnósticos de Bethesda revisados.....	64
<b>Quadro 5</b> Painel de Bethesda original.....	68
<b>Quadro 6</b> Painel Pentaplex de marcadores de mononucleotídeos.....	69
<b>Quadro 7</b> Tipos de mutações nos genes do sistema MMR.....	75



	<b>Pág.</b>
<b>RESUMO</b> .....	xvii
<b>ASBTRACT</b> .....	xxi
<b>1- INTRODUÇÃO</b> .....	47
<b>1.1- O CÂNCER DE CÓLON</b> .....	51
<b>1.2- A SÍNDROME DE LYNCH</b> .....	53
1.2.1- Características gerais da SL.....	55
1.2.2- A causa genética.....	56
1.2.3- Mecanismos patogênicos.....	61
1.2.4- A utilidade clínica da instabilidade de microssatélites e da imunohistoquímica.....	62
1.2.5- Complicações do processo diagnóstico.....	71
1.2.6- Fenótipos e correlações genótipo-fenótipo na SL.....	74
1.2.7- Variantes fenotípicas.....	76
1.2.8- Justificativa.....	83
<b>2- OBJETIVOS</b> .....	85
<b>3- MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	89



<b>3.1- Casuística.....</b>	<b>91</b>
<b>3.2- Extração do DNA tumoral e pesquisa de instabilidade de microssatélites.....</b>	<b>93</b>
<b>3.3- Análise do DNA constitutivo.....</b>	<b>97</b>
<b>4- RESULTADOS.....</b>	<b>105</b>
<b>4.1- Primeira fase - pesquisa de MSI.....</b>	<b>105</b>
<b>4.2- Segunda fase - avaliação clínica e genotipagem.....</b>	<b>113</b>
<b>5- DISCUSSÃO.....</b>	<b>157</b>
<b>6- CONCLUSÃO.....</b>	<b>173</b>
<b>7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>177</b>
<b>8- ANEXOS.....</b>	<b>205</b>
<b>9- APÊNDICES.....</b>	<b>207</b>





# 1- INTRODUÇÃO



Há muito tempo as relações entre malformações congênitas e tumores têm sido exploradas pelos patologistas e discussões a respeito das raízes comuns desses erros de desenvolvimento continuam até o presente. Alguns dos fatos conhecidos a respeito de suas relações e associações serão revisados nas próximas páginas. Neoplasias congênitas serão abordadas porque elas, assim como as malformações congênitas, datam, em sua origem, ao período pré-natal. Fatores pré-natais algumas vezes também são discerníveis em tumores que surgem muitos anos e até mesmo décadas após o nascimento, como demonstrado pelas neoplasias resultantes de anomalias gênicas ou cromossômicas. Múltiplos tumores em indivíduos e agregação de neoplasias em irmandades e famílias serão abordadas porque, algumas vezes, elas revelam fatores etiológicos não reconhecíveis em incidentes esporádicos<sup>(1)</sup>.

Existem livros que são atemporais, não pela atualidade do conhecimento, este se desatualiza inexoravelmente, mas pela qualidade das informações e ideias que expõem. As palavras acima são de Warkany<sup>(1)</sup> que, como Dante, adverte aqueles que adentram a buscar as relações entre genética, desenvolvimento e câncer no capítulo de tumores do seu famoso livro de anomalias congênitas. Suas afirmações continuam sendo a verdade e o desafio para qualquer um que queira se aventurar pelo caminho do estudo da correlação do câncer com a hereditariedade, ou, antes de mais nada, encará-lo também como um erro inato do desenvolvimento.

Câncer é o termo empregado para se referir a toda neoplasia maligna e que significa, em latim, caranguejo. Essa denominação provavelmente se deva ao fato de a doença “se prender” ao organismo de maneira obstinada como um caranguejo, em uma alusão às dificuldades terapêuticas<sup>(2)</sup>.

---

<sup>1</sup>Original em inglês - em tradução livre

Em uma definição que pode ser considerada simples, Vogelstein e Kinzler<sup>(3)</sup> conceituam câncer da seguinte forma:

Os cânceres são os tumores que adquiriram a capacidade de invadir os tecidos normais circunjacentes. A forma mais avançada desse processo invasivo é a metástase, um estado no qual as células cancerosas escapam de sua localização original, se deslocam por via hematogênica ou linfática e estabelecem residência em sítios distantes. A única diferença entre um tumor maligno (ou seja, câncer) e um tumor benigno é a capacidade de invasão do primeiro<sup>(3)2</sup>.

Na realidade, o termo câncer, quando empregado de forma genérica, representa um grupo heterogêneo de doenças que compartilham alguns atributos biológicos, conhecidos como “capacidades adquiridas”, que são as capacidades de:

- gerar os próprios estímulos mitogênicos;
- resistir à ação de sinais exógenos inibitórios para o crescimento;
- evadir-se da apoptose;
- proliferar-se sem limites (imortalização);
- adquirir vasculatura (angiogênese);
- invasão e metástase.

Essencialmente, são essas características que diferenciam uma célula normal de uma cancerosa<sup>(4,5)</sup>.

Como um conjunto genérico de doenças, o câncer é uma das principais causas de morbi-mortalidade globalmente, sendo responsável por aproximadamente um quarto de todas as mortes, colocando-se apenas atrás dos

---

<sup>2</sup>Original em inglês - em tradução livre

óbitos por eventos cardiovasculares. Em 2008 a estimativa mundial era de 12,7 milhões de casos novos por ano, e 7,6 milhões de óbitos relacionados ao câncer, 64% dos quais nos países em desenvolvimento<sup>(6,7)</sup>.

No Brasil, os dados do DATASUS também mostram que, como causa de óbito, as neoplasias malignas somente estão atrás dos eventos cardiovasculares. As estimativas do Ministério da Saúde/Instituto Nacional de Câncer projetam 518.510 casos novos de câncer para o ano de 2013<sup>(8)</sup>. Tais dados, associados ao envelhecimento da população brasileira, colocam as neoplasias malignas no centro da temática dos problemas de saúde pública, indicando a necessidade de políticas específicas.

No que se refere ao tema principal deste trabalho, falar de genes de reparo de DNA é falar de câncer de cólon, particularmente na sua forma hereditária. Por sua vez, discutir câncer de cólon hereditário é falar de síndrome de Lynch, que estará no centro de toda a revisão que será apresentada.

## **1.1- O Câncer de cólon**

Mundialmente, o câncer de cólon e reto (CCR) é a terceira neoplasia mais incidente em ambos os sexos. No Brasil, tem-se observado um aumento na sua incidência entre 1979 e 2010, sendo a quarta causa de morte por câncer entre os homens e a terceira entre as mulheres, com um total de 30.000 casos novos projetados para o ano de 2013<sup>(8-10)</sup>.

Diferenças raciais e étnicas na incidência de câncer de cólon e reto, muito provavelmente refletindo diferentes hábitos de vida e constituições genéticas, têm sido descritas em vários lugares. De uma maneira geral os países do ocidente têm incidência maior que os do oriente e tal variação sugere não somente a existência de um componente étnico e genético, mas também que os fatores ambientais exercem importante papel na patogênese deste tipo de câncer. Como causas ambientais, considera-se uma vasta gama de práticas e atitudes

difíceis de definir, como culturais, sociais e alimentares, ou seja, o estilo de vida particular a cada população e indivíduo. São considerados fatores de risco as dietas ricas em gordura e carne, a baixa ingestão de fibras de verduras e frutas, além da baixa atividade física<sup>(11,12)</sup>.

O *câncer colorretal familiar*, identificado na forma de agregados familiares de CCR, é definido por Lynch<sup>(13)</sup> como sendo a presença de dois ou mais familiares em 1º grau com CCR. Aproximadamente 20% de todos os cânceres de cólon ocorrem no contexto de uma história de recorrência dentro da família<sup>(13,14)</sup>. Essa associação com agregados foi crucial para a compreensão da carcinogênese e foi o ponto de partida para a identificação de entidades nosológicas específicas dentro do CCR que cursam com um caráter hereditário.

Em torno de 8% de todos os casos de CCR, ou seja, aproximadamente um terço daqueles casos com agregação familiar, podem ser explicados por uma dentre quatro síndromes hereditárias, a saber<sup>(14)</sup>:

- Síndrome de Lynch (previamente denominada câncer colorretal hereditário sem polipose - HNPCC);
- Polipose adenomatosa familiar (PAF);
- Síndrome da polipose juvenil; e
- Síndrome de Peutz-Jeghers.

Apesar de outras síndromes terem sido descritas, geralmente são consideradas variantes de uma das quatro acima.

Clinicamente, os cânceres de cólon hereditários podem ser subdivididos em dois grandes grupos: aqueles que cursam com a presença de múltiplos pólipos colorretais (polipose), e aqueles que cursam sem polipose. Das síndromes citadas acima, a única que cursa sem polipose é a síndrome de Lynch (SL), ainda que, em alguns casos, pólipos possam ser encontrados nessa síndrome.

## 1.2- A Síndrome de Lynch

A SL é uma doença hereditária, com padrão de herança autossômico dominante, cuja principal característica é o risco aumentado para o desenvolvimento de câncer, principalmente de cólon e endométrio. Ela é a forma hereditária mais comum de CCR. As estimativas mais conservadoras colocam-na como sendo responsável por uma proporção de 2,8% do total de casos, mas que, segundo algumas projeções, pode representar 5-7% e quase metade dos casos familiares dessa neoplasia<sup>(15,16)</sup>. Diferente da polipose adenomatosa familiar, que possui o fenótipo de pólipos intestinais que a torna de fácil identificação clínica, a SL não possui uma alteração clínica específica que permita sua identificação ao exame do intestino do paciente. Por esse motivo, sua suspeição baseia-se principalmente na idade jovem dos cânceres e na história familiar<sup>(13,17-19)</sup>.

Os primeiros relatos de casos de SL são antigos e remontam a 1895 quando Aldred Warthin, um patologista da Faculdade de Medicina da Universidade de Michigan, em Ann Arbor, reconheceu um agrupamento de casos de câncer na família de sua costureira. Segundo relata Lynch<sup>(20)</sup>, naquela época ela parecia deprimida e Warthin, sendo um médico atencioso e preocupado, perguntou-lhe porque estava daquele jeito, tendo como resposta a queixa de que ela achava que iria morrer de câncer do trato gastrointestinal ou dos seus órgãos reprodutores, uma vez que todos em sua família morriam de um desses tumores. Ao final, ela de fato morreu de carcinoma de endométrio metastático<sup>(20,21)</sup>. A partir de então, Warthin iniciou a fazer heredogramas dessa e de outras famílias com câncer. Nessa família, em particular, ele registrou quatro gerações acometidas por câncer de útero ou do trato gastrointestinal e denominou esse heredograma de “Família G”<sup>(22)</sup>.

Lynch<sup>(20)</sup> viveu, anos mais tarde, uma experiência parecida que ele relata em suas palavras:

Em 1962, Lynch, então um R2 de medicina interna, foi chamado para ver um paciente que estava se recobrando de *delirium tremens*, e que, em uma afirmação muito similar àquela da costureira de Warthin, disse que ele sabia que iria morrer de câncer colorretal (CCR), que era muito prevalente em sua família; ele deu essa desculpa para seu etilismo. Exatamente como previu, ele morreu de câncer. Naquela época, a única forma hereditária de CCR conhecida era a polipose adenomatosa familiar (PAF). Inicialmente, quando um heredograma da família desse paciente foi feito, inferiu-se que seria provavelmente uma forma de PAF, devido ao grande número de casos de CCR. Entretanto, esse diagnóstico presumido mudou significativamente quando chegaram os relatórios dos exames anátomo-patológicos, uma vez que uniformemente não mostravam nenhuma evidência de adenomas múltiplos do cólon em nenhum dos afetados com CCR<sup>(20)3</sup>.

Lynch (20) conta, ainda, que naquela época (década de 1960), o trabalho de Warthin estava “perdido”. Ele levou seu relato a uma apresentação oral em uma reunião da Sociedade Americana de Genética Humana, em 1964, na qual estava presente Marjorie Shaw, uma médica geneticista da Universidade de Michigan, que atendia uma família semelhante e decidiu colaborar com Lynch, levando a uma publicação histórica de 1966<sup>(23)</sup>. A família inicialmente avaliada por Lynch era conhecida como Família N (devido a ser do estado de Nebraska), e a família de Shaw como família M (devido a ser do estado de Michigan)<sup>(13,20,21,23)</sup>. Após essa publicação, o patologista sucessor de Warthin na Universidade de Michigan ofereceu a Lynch acesso irrestrito a todo o arquivo de Warthin. Juntamente com Ann Krush, uma assistente social, elevistou pessoas da Família G que residiam na região de Ann Arbor, e foram até a Alemanha procurando as origens do câncer na família, buscando confirmação patológica, quando disponível, e ampliando o heredograma. Essa família era numerosa e foi descrita

---

<sup>3</sup>Original em inglês - em tradução livre.

outras vezes desde então, sendo a mais recente em uma publicação de 2005<sup>(13,20,21,23,24)</sup>.

Essa história encontra eco na própria história da genética médica, lembrando que o início do que se conhece hoje como aconselhamento genético se deu pela proposta de Reed, em 1947, de prestar um serviço social genético às famílias com alguma condição geneticamente determinada<sup>(25)</sup>. Além disso, é uma história que ressalta a importância da multi e interdisciplinaridade e os aspectos multifacetados do elemento *humano* que está por trás dos dois lados do processo diagnóstico (médico e paciente). Tanto na história da costureira de Warthin como na do paciente de Lynch percebe-se a angústia e ansiedade com a auto-percepção de uma condição que recorria na família desses pacientes; a “*dúvida quase certa*” do enfrentamento e morte por uma condição de difícil tratamento e que traz muito sofrimento aos seus portadores - sofrimento esse antecipado e dirigido a uma forma de “escape” no etilismo do paciente de Lynch.

Além disso, nas duas histórias, percebe-se a displicência dos outros médicos em ouvir seus pacientes e valorizar seus relatos, algo que tanto Warthin quanto Lynch souberam fazer e tentaram buscar uma resposta que até então não tinha explicação. Outro fato importante que já pode ser notado é a importância de se examinar os familiares afetados e de se buscá-los ativamente, e no caso do estudo do câncer, de se obter uma cópia dos laudos dos exames anátomo-patológicos de todas as pessoas acometidas na família.

### 1.2.1- Características gerais da SL

O quadro clínico típico da SL é o da predisposição ao câncer. Clinicamente essa predisposição se traduz na história pessoal de um câncer em idade jovem e na história familiar de recorrência de casos de câncer em pelo menos uma das ascendências. Portanto, para sua suspeição é preciso um olhar clínico atento e interessado e, ainda assim, em uma época em que a diminuição

do número de filhos na população reduz a sensibilidade da história familiar como ferramenta<sup>(26)</sup>, vários casos podem não ser diagnosticados.

Assim como nos casos esporádicos, na SL os CCR acometem mais homens que mulheres; entretanto, as características epidemiológicas e anátomo-patológicas formam um padrão peculiar.

Enquanto os tumores colorretais esporádicos costumam acometer principalmente o cólon esquerdo, na SL, entre 60 e 70% das vezes eles ocorrem proximalmente à flexura esplênica e são mais precoces, com uma idade média de 45 anos, ou seja, até 20-25 anos mais cedo do que nos tumores esporádicos. Além disso, verifica-se um aumento no risco para cânceres sincrônicos e metacrônicos do cólon, endométrio, estômago, vias biliares, vias urinárias, pâncreas, entre outros, conferindo um risco para o desenvolvimento de qualquer tipo de câncer, até os 70 anos de idade, da ordem de 91% para homens e 69% para mulheres, com alguma variação em função do gene alterado<sup>(3,13,21,27,28)</sup>.

Também do ponto de vista histopatológico, os tumores associados à SL têm características de certa forma únicas. Como já mencionado, os tumores ocorrem em idade precoce, a maioria em cólon proximal. Usando a classificação patológica tradicional, 37% dos CCR na SL são classificados como pouco diferenciados, de alto grau e mais de 35% são do tipo mucinoso, o que sugeriria uma maior agressividade da doença. Também é comum a presença de infiltração linfocítica acentuada e agregação linfóide na margem tumoral (em uma reação do tipo Crohn)<sup>(13,17,29)</sup>. Entretanto, ao contrário do que isso poderia sugerir, os CCR, na SL, têm em geral uma melhor evolução clínica do que seus equivalentes esporádicos quando pareados por estadiamento<sup>(13,29)</sup>.

### 1.2.2- A causa genética

Em 1992, o gene da PAF já estava identificado, o que permitiu que ele fosse excluído como sendo responsável pela síndrome de Lynch<sup>(30)</sup>.

No ano seguinte, foi demonstrada a ocorrência de instabilidade em sequências repetitivas do DNA em tumores de cólon esporádicos e a procura dessa alteração nos tumores de pacientes com a SL mostrou que a mesma está associada à SL<sup>(31-33)</sup>.

Na época, essa característica molecular específica passou a ser conhecida como fenótipo de *erros de replicação (replication errors - RER)*, atualmente denominada instabilidade de microssatélites (MSI). Os microssatélites são regiões genômicas nas quais ocorrem repetições de um único nucleotídeo ou de sequências curtas de DNA, sendo a mais comum a forma “(CA)<sub>n</sub>”. Há milhares desses microssatélites espalhados por todo o genoma e é comum que mutações ocorram nesses locais durante a replicação do DNA por um mau alinhamento das subunidades de repetição, provocando um alongamento ou encurtamento da sequência, daí derivando o termo “instabilidade”. Normalmente, tais falhas da replicação são corrigidas imediatamente pela ação dos sistemas de reparo do DNA, no entanto, em qualquer situação na qual as proteínas de reparo não estejam funcionando adequadamente mutações se acumularão nos microssatélites<sup>(34,35)</sup>.

Se a SL não possuía um fenótipo reconhecível, como a PAF tinha, com essa descoberta ela ganhou um fenótipo molecular facilmente identificável. Restava encontrar sua causa.

A observação da ocorrência de MSI na SL implicava a existência de alterações nos processos de reparo de pareamento de bases, processos esses que naquele momento já haviam sido descritos em bactérias e leveduras, nas quais os principais componentes do sistema são os complexos proteicos MutS, MutL e MutH<sup>(36-38)</sup>, o que abriu o caminho para a próxima descoberta.

Na década de 1990, o homólogo humano de MutS, *hMSH2*, e o homólogo humano de MutL, *hMLH1*, foram identificados e associados como causadores da SL<sup>(39-41)</sup>. Posteriormente, o gene *hPMS2* e o *hMSH6* também foram identificados como causa da síndrome<sup>(42-44)</sup>. Em relação ao gene *hPMS1*,

apesar de variantes terem sido descritas, seu papel de causador da SL ainda resta ser demonstrado, uma vez que nenhuma mutação deletéria foi detectada segregando com o fenótipo em famílias afetadas<sup>(20)</sup>. Em conjunto, *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e *hPMS2* (ou simplesmente *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*) formam o sistema de reparo de erros de pareamento de bases do DNA (sistema Mismatch Repair - MMR), cujas localizações podem ser vistas no Quadro 1<sup>(3,45)</sup>.

**Quadro 1-** Localização e tamanho dos genes do sistema MMR

Gene	Cromossomo	Nº de Éxons	Tamanho (kb)
<i>hMLH1</i>	3p21	19	58
<i>hMSH2</i>	2p16	16	73
<i>hMSH6</i>	2p15	10	20
<i>hPMS2</i>	7p22	15	16

**kb**=quilobases

O sistema de reparo MMR é altamente conservado do ponto de vista de evolução. É formado por algumas proteínas nucleares que agem de maneira orquestrada para detectar e reparar erros que podem ocorrer na fase de síntese (fase S), durante a replicação do DNA e durante a recombinação, contribuindo substancialmente para a manutenção da estabilidade e fidelidade genética<sup>(46-52)</sup>. Acredita-se que esse sistema aumenta a fidelidade da replicação de 100 a 1000 vezes<sup>(51)</sup>.

Os elementos mais importantes desse sistema, que estão diretamente relacionados à gênese da SL, são as famílias de proteínas homólogas de MutS (MSH) e de MutL (MLH), ambas pertencentes à superfamília das ATPases.

## O complexo *MutS*

As proteínas MSH sempre atuam como heterodímeros nos eucariotas. A proteína MSH2 é sempre obrigatória e pode *dimerizar* tanto com MSH6 quanto com MSH3, formando os heterodímeros MutS $\alpha$  e MutS $\beta$ , respectivamente<sup>(53)</sup>. O heterodímero MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ ), reconhece e se liga preferencialmente a erros de pareamento de base única, repetições de mononucleotídeos e pequenas alças de inserção/deleção. Esse dímero forma um “grampo” em torno do DNA, possuindo um sítio de ligação ao DNA e um sítio de ligação a ATP, ambos importantes para o funcionamento correto do complexo<sup>(47,54)</sup>. Por sua vez o dímero MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ ) reconhece preferencialmente grandes alças (*loops*) de inserção/deleção que ocorrem em repetições de dinucleotídeos e outras sequências repetitivas<sup>(50)</sup>.

No geral, o papel de MutS é apenas o de sinalizar os locais com erro de pareamento, sendo necessárias outras proteínas para sua correção. A compreensão atual dos mecanismos de reconhecimento de erros de pareamento por MutS ainda é incompleta. A diferenciação entre esses erros e as sequências normais não é algo trivial e ainda não se sabe como tais alterações são identificadas<sup>(47)</sup>.

## O complexo *MutL*

A família MutL é formada por uma proteína obrigatória MLH1, que pode *dimerizar* com PMS2, PMS1 ou MLH3, formando os heterodímeros MutL $\alpha$ , MutL $\beta$ , e MutL $\gamma$ , respectivamente<sup>(55,56)</sup>. Segundo Hsieh et al.<sup>(47)</sup>, a função de MutL tem sido enigmática, uma vez que é uma ATPase fraca e se liga de forma inespecífica ao DNA, por isso tem sido descrita como uma coordenadora, que interage e, em alguns casos, estimula a atividade de um grande número de outras proteínas<sup>(47)</sup>. O heterodímero MLH1-PMS2 (MutL $\alpha$ ) tem o principal papel na atividade de reparo pós-replicação. Ele possui atividade de endonuclease e interage com o complexo MutS-DNA<sup>(55)</sup>.

A excisão do erro é realizada pela Exonuclease I (Exo I) e PCNA (*proliferating-cell-nuclear antigen*), seguida de ressíntese e religação da fita de DNA<sup>(55)</sup>. Pouco se sabe a respeito dos demais heterodímeros de MutL em humanos, mas acredita-se que tenham papel no reparo de erros base-base e alças de inserção/deleção<sup>(47)</sup>. Um resumo das informações pode ser visto no Quadro 2.

**Quadro 2-** Componentes do sistema MMR (51)

<i>E. coli</i>	Função na <i>E. Coli</i>	Homólogos	Função nos eucariotas
MutS	Liga-se aos erros	MSH2-MSH6 (MutS $\alpha$ )	Repara bases únicas (base-base), repara alças de inserção de 1-2 bases
		MSH2-MSH3 (MutS $\beta$ )	Repara algumas inserções /deleções de base única e alças de inserção/deleção $\geq 2$ bases. Parcialmente redundante com MSH2-MSH6
MutL	Coordena múltiplos passos no processo MMR	MLH1-PMS2 (PMS1 na levedura) (MutL $\alpha$ )	Coordena os eventos de ligação ao sítio de erro pelos homólogos de MutS, reparo do DNA, ressíntese e atividade de endonuclease (PMS2)
		MLH1-MLH2 (hPMS1) (MutL $\beta$ )	Função do heterodímero humano desconhecida. Suprime alguma mutagênese por inserção/deleção em leveduras
		MLH1-MLH3 (MutL $\gamma$ )	Suprime alguma mutagênese por inserção/deleção. Participa da meiose
MutH	Cliva sítios GATC hemimetilados na fita de DNA recém-sintetizada	Não há	

### 1.2.3- Mecanismos patogênicos

Alguns genes que possuem microssatélites em suas sequências codificadoras já foram identificados, sendo que a perda de uma ou mais unidades de repetição nesses genes levaria a uma mudança na matriz de leitura (*frameshift*) e perda de função daquele gene<sup>(57,58)</sup>. Mutações introduzidas em alguns desses genes presumivelmente resultariam em diversas alterações da função celular como alteração da transdução de sinal, apoptose, reparo do DNA, regulação de transcrição, entre outras<sup>(51)</sup>. Particularmente o *TGFβR<sub>2</sub>* (*transforming growth factor receptor*) foi objeto de estudos que demonstraram que sua sequência de microssatélites está mutada em 90% dos tumores de cólon com MSI, o que não ocorre nos tumores estáveis para microssatélites (MSS). É relevante lembrar que a sinalização produzida normalmente por esse gene inibe a proliferação no epitélio do cólon<sup>(55)</sup>. Também é interessante o fato de que todos os genes do sistema MMR, com exceção do *hMLH1*, possuem sequências de microssatélites que, se mutadas, poderiam amplificar a falha do sistema<sup>(50,55)</sup>.

Hoje, sabe-se que o sistema MMR reconhece não apenas os erros de pareamento, mas também erros que envolvem bases danificadas ou modificadas por agentes que causam dano ao DNA, como por exemplo, 8-oxoguanina, agentes alquilantes, pirimidinas halogenadas (como o 5-fluorouracil-5FU), fotoprodutos de ultravioleta e adutos de cisplatina. Do ponto de vista clínico, uma das características importantes é que a perda de atividade MMR deixa as células menos suscetíveis à morte induzida por alguns desses agentes. Acredita-se que isso reflita possíveis papéis do sistema MMR na sinalização de dano ao DNA em que ele dispararia pontos de controle e parada do ciclo celular e, possivelmente, induziria a apoptose<sup>(47,50,51,55)</sup>.

Além disso, o sistema MMR possui importante papel na recombinação, que varia de uma proteção contra a recombinação homóloga (de sequências relacionadas, mas não idênticas), passando pela correção de erros de recombinação na meiose, indução/inibição da expansão de trinucleotídeos

(importantes em algumas doenças hereditárias), até a geração da diversidade do repertório de imunoglobulinas (que envolve recombinação dos segmentos “VDJ” da região hipervariável e troca de classe de cadeia pesada das imunoglobulinas)<sup>(47)</sup>.

Ainda que o estudo sobre o sistema MMR na carcinogênese humana venha, preponderantemente, sendo feito voltado às alterações nas funções de reparo, as demais funções do sistema podem ser igualmente importantes, já tendo sido descrita uma mutação que leva ao fenótipo de síndrome de Lynch sem a presença de instabilidade de microssatélites, na qual o defeito celular é decorrente da falha de interação com a proteína “FANCI” (proteína codificada por um dos *loci* responsáveis pela síndrome de Fanconi), comprometendo a capacidade de resposta a uma lesão do DNA, causando o câncer<sup>(59)</sup>.

#### 1.2.4- A Utilidade Clínica da Instabilidade de Microssatélites e da Imunohistoquímica

Tomando como referência o banco de dados do *InSiGHT* (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*), as mutações “depositadas” de *hMLH1* correspondem a 50%, as de *hMSH2* a 39% e as de *hMSH6* a 7%<sup>(60)</sup>. As mutações de *hPMS2* representariam menos de 5%<sup>(61-63)</sup>.

Hampel et al.<sup>(64)</sup>, no maior estudo populacional a esse respeito nos EUA, identificaram valores diferentes daqueles do banco de dados do *InSiGHT*. Estudando 1066 pacientes com CCR, encontraram 23 com SL: *hMLH1* (22%), *hMSH2* (56%), *hMSH6* (13%) e *hPMS2* (9%), indicando um papel mais importante de *hPMS2* do que antes previsto.

O grande desafio que sempre existiu para os que lidam com síndromes hereditárias de câncer é identificar quais pacientes devem ser testados. Na SL, considerando que existem diversos genes, ainda que dois deles concentrem mais de 50% das mutações, idealmente a análise deveria ser feita nos

quatro genes, para garantir a identificação de todas as famílias mutadas. Isso incluiria o sequenciamento completo e a pesquisa de rearranjos. Para tanto, uma estratégia de teste custo-efetiva seria essencial. Foi justamente nesse ponto que se mostrou a principal utilidade clínica da pesquisa de MSI, ou seja, na identificação de pacientes com fenótipo da SL<sup>(55,56)</sup>.

A suspeita da SL é feita, do ponto de vista clínico, a partir da história pessoal e familiar. Até mesmo a presença de um único familiar em primeiro grau que desenvolva um CCR ou um câncer de endométrio em idade precoce deve levantar essa possibilidade. Os principais guias diagnósticos (*guidelines*) usados nos países ocidentais são os critérios de Amsterdã e de “Bethesda Revisados”. Tais critérios podem ser vistos nos Quadros 3 e 4.

**Quadro 3-** Critérios diagnósticos de Amsterdã I e II<sup>(35)</sup>

<b>AMSTERDÃ</b>
<b>PELO MENOS TRÊS PARENTES COM CÂNCER DE CÓLON-RETO CONFIRMADO <u>HISTOLOGICAMENTE</u></b>
Um é parente em primeiro grau dos outros dois
Pelo menos duas gerações sucessivas são afetadas
Pelo menos um dos casos de câncer de cólon-reto foi diagnosticado antes dos 50 anos
Foi excluída polipose adenomatosa familiar
<b>AMSTERDÃ II</b>
<b>PELO MENOS TRÊS PARENTES TÊM UM CÂNCER ASSOCIADO COM SL (cólon, reto, endométrio, ureter, pelve renal ou intestino delgado)</b>
Um é parente em primeiro grau dos outros dois
Pelo menos duas gerações sucessivas são afetadas
Pelo menos um dos casos com câncer associado à SL deve ter sido diagnosticado antes dos 50 anos
Foi excluída polipose adenomatosa familiar
Os tumores devem ser verificados com documento comprobatório, sempre que possível

#### Quadro 4- Critérios diagnósticos de Bethesda revisados<sup>(65)</sup>

<b>BETHESDA REVISADO (2003)</b> <b>É NECESSÁRIO APENAS UM DOS CRITÉRIOS ABAIXO:</b>
Indivíduo diagnosticado com câncer de cólon/reto antes dos 50 anos de idade.
Indivíduo com câncer de cólon/reto sincrônico ou metacrônico OU outros <u>tumores</u> associados a SL (que incluem estômago, bexiga, ureter, pelve renal, trato biliar, cérebro (glioblastoma), adenomas de glândulas sebáceas, ceratoacantomas e carcinoma do intestino delgado), independente da idade.
Indivíduos com câncer de cólon/reto com morfologia de alta instabilidade de microssatélites (MSI-H) diagnosticado antes dos 60 anos de idade.
Indivíduo com câncer de cólon/reto com um ou mais parentes em primeiro grau com câncer de cólon/reto ou outro <u>tumor</u> associado à SL. Um dos cânceres deve ter sido diagnosticado antes dos 50 anos de idade (isso inclui adenoma, que deve ter sido diagnosticado antes dos 40 anos).
Indivíduo com câncer de cólon/reto com dois ou mais parentes com câncer de cólon/reto ou outro <u>tumor</u> associado à SL, independente da idade.

Os critérios originais de Amsterdã (Amsterdã I) foram desenvolvidos pelo *International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer* (ICG-HNPCC) com a finalidade de permitir uniformidade na seleção de pacientes para a realização de estudos colaborativos multicêntricos e identificação do gene<sup>(19,35,65,66)</sup>. Desde então, muitos passaram a utilizá-lo como critério diagnóstico da SL, o que logo gerou polêmica, uma vez que eles não haviam sido criados com esse propósito e também porque não incluíam características importantes como a presença de cânceres extra-cólicos na família. Hoje, sabe-se que até 39% das famílias com mutações não preenchem os critérios de Amsterdã I e, de forma inversa, em 40% das famílias com esse critério não são identificadas mutações<sup>(27,67)</sup>.

Em 1996, com os avanços na compreensão das manifestações clínicas, histológicas e moleculares da SL, a necessidade de um conjunto de recomendações para o diagnóstico genético da SL ficou óbvia. O uso dos critérios

de Amsterdã estava atingindo seu propósito original, mas a sua sensibilidade limitada dificultava decisões quanto à escolha dos pacientes que deveriam ser submetidos ao teste genético. Isso levou o *National Cancer Institute (NCI)* a promover o *International Workshop on HNPCC* durante o qual foram desenvolvidos critérios que serviriam de guia para a identificação dos indivíduos que deveriam ter seu material tumoral testado quanto à existência de instabilidade de microssatélites. Tais critérios ficaram conhecidos como “critérios de Bethesda” e servem principalmente para ajudar na decisão de quais indivíduos com câncer devem ser submetidos à realização de teste genético, sendo mais sensíveis e menos específicos<sup>(35,65)</sup>.

Após a criação dos critérios de Amsterdã e de Bethesda, novos conhecimentos foram agregados, particularmente quanto à pesquisa de instabilidade de microssatélites e ao uso da técnica de imunohistoquímica (IHQ) para detecção da imunoexpressão das proteínas MMR nos tumores. Nesse sentido, tanto a presença de MSI quanto a ausência de proteínas MMR em um tumor podem ser interpretados como consequências dos defeitos no funcionamento dos genes do sistema MMR e, portanto, a presença de uma dessas características (MSI ou alteração na imunoexpressão para as proteínas MMR) pode ser usada como um marcador fenotípico (molecular) do diagnóstico de SL. Em outras palavras, a identificação de uma dessas características no tumor, indicaria tratar-se, presumivelmente, de um caso de SL.

No entanto, existem limitações nessa premissa. Atualmente, sabe-se que ao se examinar todos os CCRs (sem nenhuma seleção prévia), até 15% deles possuem alteração na imunoexpressão das proteínas MMR e MSI. Desses 15%, três pontos percentuais (3%) são realmente casos de SL, os demais 12% correspondem a tumores esporádicos nos quais ocorreu silenciamento devido a metilação somática do promotor das duas cópias de *hMLH1*, gerando também MSI ou perda da imunoexpressão de MLH1<sup>(68)</sup>. Isso cria a necessidade de um ponto a mais de diagnóstico diferencial nesse processo de identificação das famílias mutadas.

Auxiliando nessa diferenciação, não se sabe os motivos, mas em termos de genes-alvo, existe uma diferença importante entre os tumores com MSI devido a metilação somática do *hMLH1* e aqueles dos pacientes com SL. Em cerca de metade dos CCR esporádicos que possuem metilação do *hMLH1*, encontra-se mutado (como gene-alvo) o *BRAF* (mutação V600E)<sup>(56)</sup>. Por sua vez, nos CCR na SL geralmente encontra-se mutação no gene *KRAS*. É interessante notar que ambas são funcionalmente equivalentes, mas exclusivas (seus produtos atuam na mesma via, regulando a proliferação epitelial)<sup>(55)</sup>. Esse fato pode ser explorado no processo diagnóstico da SL para se diferenciar tumores esporádicos com MSI causados por metilação somática, daqueles que tenham MSI devido a SL. A presença de *BRAF*<sup>V600E</sup> indica um tumor esporádico com MSI e essencialmente exclui o diagnóstico de SL<sup>(69-71)</sup>.

Um aspecto controverso diz respeito a qual metodologia utilizar na detecção do fenótipo molecular de SL. O uso da IHQ tem a vantagem de ser mais amplamente disponível, uma vez que pode ser realizada nos laboratórios de patologia. Além disso, a identificação de uma expressão alterada de uma ou mais proteínas ajuda a guiar quais genes devem ser sequenciados. Apesar disso, os estudos que foram publicados comparando a sensibilidade das duas técnicas mostram, em geral, que a análise de MSI é ligeiramente mais sensível que a análise por IHQ. A MSI detecta os tumores deficientes em MMR em 93% das vezes, tendo perda da sensibilidade em função de mutações de *hMSH6*, que podem não dar o fenótipo típico de instabilidade.

Os primeiros estudos sobre a IHQ mostravam uma sensibilidade de 92,3%, que aumentou consideravelmente com a utilização de anticorpos contra as quatro proteínas (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2)<sup>(55)</sup>. Os casos falso-positivos da IHQ podem ser devido aos anticorpos estarem detectando o fragmento de uma proteína truncada que tenha perdido a função. Uma outra limitação da IHQ é que a marcação com o anticorpo pode ser heterogênea ao longo do tumor e afetar a interpretação e sensibilidade<sup>(28,50,55,72)</sup>. Além disso, uma questão a considerar é que os anticorpos usados em diferentes estudos podem não ter a mesma

sensibilidade, e isso é importante não só na comparação de resultados científicos, mas, sobretudo na implantação de uma rotina diagnóstica.

Também há de se considerar, nas comparações entre MSI e IHQ, que a maioria dos estudos usava o painel original de Bethesda ao avaliar a MSI, não havendo comparações com o painel *Pentaplex*, mais recente, que será comentado adiante.

### **Classificação da instabilidade de microssatélites**

Com a descoberta do fenótipo MSI, não havia padronização internacional do teste. Uma reunião de consenso internacional, em 1997, foi convocada e definiu um padrão para a definição de MSI<sup>(73)</sup>. Desde então, o termo MSI, quando não acompanhado de especificação, refere-se a instabilidade alta de microssatélites (MSI-H), que pode ser definida como a presença de mutação em mais de 30% dos marcadores de um painel de microssatélites. A instabilidade baixa de microssatélites (MSI-L), por sua vez, é definida como a presença de pelo menos um marcador mutado desde que corresponda a menos de 30% do total de marcadores do painel<sup>(73)</sup>.

Um outro tipo de instabilidade que não se enquadra na definição de MSI-H foi identificada e denominada EMAST (*elevated microsatellite alterations at selected tetranucleotide repeats*), frequentemente encontrada em tumores outros que não o CCR, que parece ser causada por uma diminuição na atividade **somática** de *hMSH3*<sup>(55)</sup>.

Até a reunião de 1997, vários painéis de marcadores eram usados para a detecção de MSI. O primeiro consenso definiu um painel de cinco marcadores, três deles com repetições de dinucleotídeos e dois com repetições de mononucleotídeos. Esse painel ficou conhecido como painel de Bethesda e seu uso necessitava de amostra de tecido tumoral e normal para efeito de comparação<sup>(55,73)</sup>. Mais recentemente, foi desenvolvido um novo painel de

cinco marcadores de mononucleotídeos que podem ser amplificados e analisados em um único ensaio, sem necessidade de comparar tecido normal. Esse painel, conhecido como painel *Pentaplex* é tão sensível e específico quanto o painel original de Bethesda (74). Além dos marcadores do painel *Pentaplex*, existem outras sequências que eventualmente podem ser utilizadas, como a repetição T<sub>(25)</sub> na região 3' não traduzida (3UTR) do gene *caspase2*, que é útil em detectar a perda de *hMSH6*<sup>(75)</sup>. Para o painel *Pentaplex*, a MSI-H também é considerada como a presença de instabilidade em pelo menos três marcadores<sup>(74,76)</sup>. Entretanto, foi proposto que, para aumentar a sensibilidade para mutações no *hMSH6*, sejam considerados MSI-H os tumores que no painel *Pentaplex* apresentem instabilidade em dois ou mais marcadores<sup>(77)</sup>.

Os marcadores de cada painel podem ser vistos nos Quadros 5 e 6.

**Quadro 5-** Painel de Bethesda original<sup>(73)</sup>

<b>Marcador</b>	<b>Gene</b>	<b>Repetições de MS</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Localização da repetição</b>
D2S123	Ligado ao <i>MSH2</i>	CA (n)	2p16	
D5S346	Ligado ao <i>APC</i>	CA (n)	5q22-23	
D17S250	Ligado ao <i>TP53</i>	CA (n)	17q12	
BAT-25	<i>c-kit</i>	A (25)	4q12	Intron 16
BAT-26	<i>MSH2</i>	A (26)	2p21	Intron 5

**Quadro 6-** Painel *Pentaplex* de marcadores de mononucleotídeos<sup>(74)</sup>

<b>Marcador</b>	<b>Gene</b>	<b>Repetições de MS</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Localização da repetição</b>
BAT-25	<i>c-kit</i>	A (25)	4q12	Intron 16
BAT-26	<i>MSH2</i>	A (26)	2p21	Intron 5
NR-21	<i>SLC7A8</i>	T (21)	14q11	5' UTR
NR-24	<i>Zinc finger 2 (ZNF-2)</i>	T (24)	2q11	3' UTR
NR-27	<i>Inhibitor of apoptosis protein-1</i>	A (27)	11q22	5' UTR

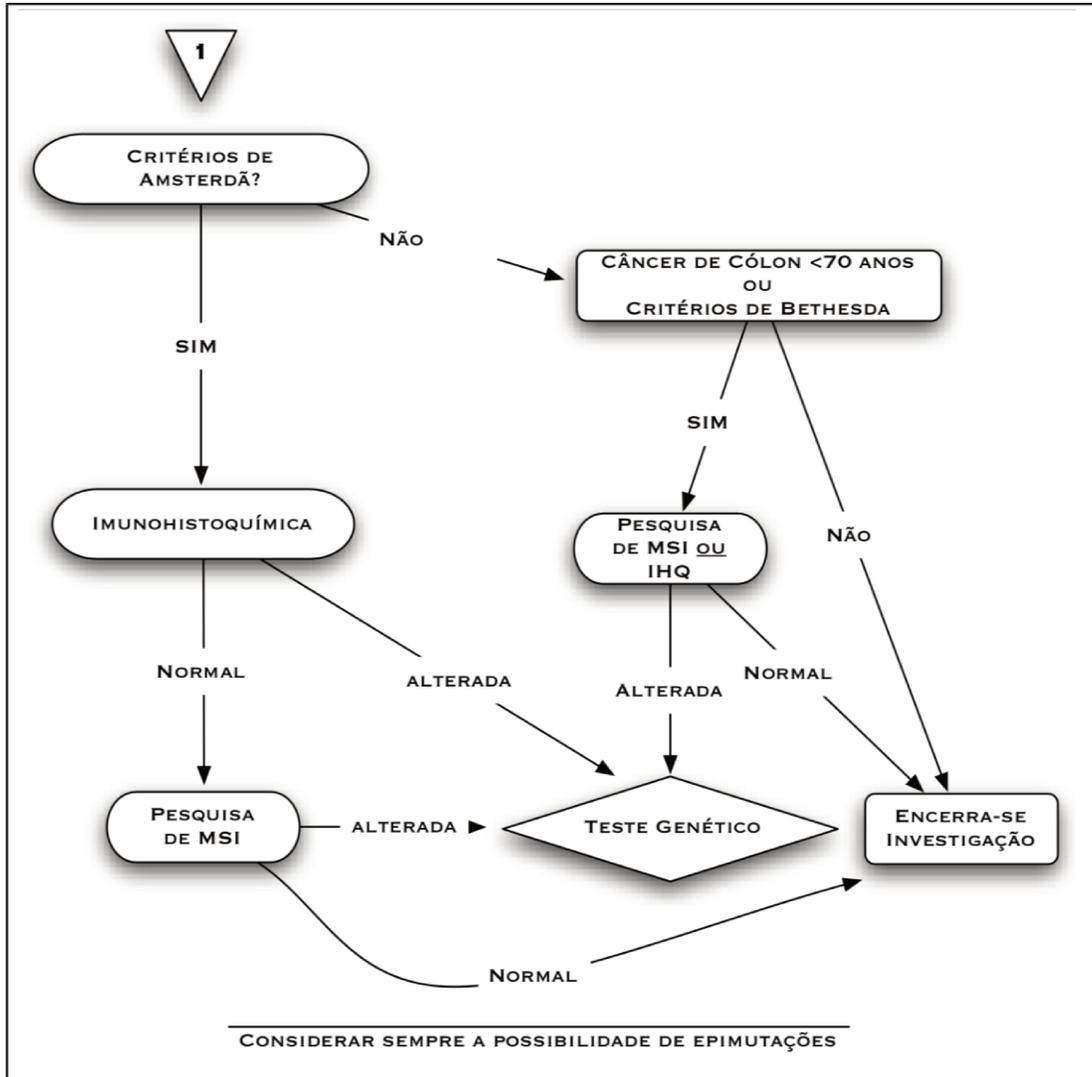
Atualmente, tanto os critérios de Amsterdã, quanto os critérios de Bethesda Revisados são utilizados para selecionar os pacientes com CCR para os quais se deve indicar a análise de MSI e (ou) a IHQ. Realizado um desses dois testes (MSI ou IHQ), aqueles indivíduos que possuem evidência de SL, ou seja, possuem MSI ou perda da imunexpressão de uma ou mais das proteínas MMR, são selecionados para prosseguirem com o sequenciamento gênico. Quando não são encontradas alterações na pesquisa de MSI ou na IHQ, não se deve realizar a pesquisa de mutações gênicas<sup>(13,28)</sup>.

Os critérios de Bethesda Revisados se mostram mais sensíveis (90%), quando comparados aos critérios de Amsterdã II (40%)<sup>(28)</sup>. Por essa razão eles devem ser preferencialmente utilizados na seleção dos pacientes para o teste. Contudo, os critérios de Amsterdã continuam sendo úteis para definir a melhor estratégia de teste, que pode ser dividida em:

- a) Famílias com probabilidade alta de mutação - aquelas que preenchem os critérios de Amsterdã. Para essas famílias uma estratégia custo-efetiva seria a realização inicial de IHQ, pois havendo perda de imunexpressão, essa anormalidade já indicaria por qual gene iniciar o sequenciamento. Se a IHQ for normal, está indicada a análise de MSI e, caso confirme-se instabilidade, é realizado o sequenciamento dos genes do sistema MMR;

**b)** Demais famílias (que preenchem “Bethesda Revisado”, mas não preenchem Amsterdã). Para essas famílias não há preferência entre um ou outro método (MSI ou IHQ), apesar que sempre pode ser argumentado a favor da IHQ a possibilidade de guiar o sequenciamento caso ela mostre alteração, mas por outro lado, possui o contra-argumento de que a sensibilidade é menor<sup>(28)</sup>.

Em relação à sensibilidade dos critérios diagnósticos, é crescente a preocupação em se aumentar a identificação dos pacientes com mutação. Uma vez que os critérios de “Bethesda Revisados” possuem sensibilidade de 90%, aproximadamente 10% dos casos não são diagnosticados, o que ocorre principalmente naqueles pacientes que tiveram diagnóstico de câncer com mais de 50 anos de idade. Para esses pacientes, torna-se necessária especial atenção às características do tumor, na tentativa de enquadrá-los em um dos critérios. Tal preocupação é tão importante, especialmente em um cenário de famílias menores, que recentemente o grupo europeu recomendou a realização de IHQ/MSI para todos os pacientes com CCR abaixo de 70 anos de idade<sup>(28,78)</sup>. Um fluxograma diagnóstico pode ser visto na Figura 1.



**Figura 1-** Fluxograma diagnóstico na Síndrome de Lynch

### 1.2.5- Complicações do processo diagnóstico

A despeito de todo avanço nas técnicas em genética molecular, o sequenciamento gênico na síndrome de Lynch consegue identificar uma mutação em apenas 70% das vezes e, ainda assim, quando se consideram somente aquelas famílias que preenchem critérios de Amsterdã e que apresentam MSI<sup>(13)</sup>.

Nos últimos anos foram descritas algumas observações que explicam parte dos casos que não possuem mutação identificada e que serão abordados a seguir.

Além do silenciamento gênico somático, já citado anteriormente, assim como para outras condições geneticamente determinadas, descreveu-se também para a SL a ocorrência de alterações epigenéticas, que podem ser denominadas “epimutações germinativas”. Tais epimutações já foram descritas para *hMLH1* e para *hMSH2* em um pequeno número de pacientes com SL.

O primeiro caso de epimutação germinativa foi descrito com a identificação da metilação de um alelo do *hMLH1* no sangue periférico e presença de deleção do alelo não-metilado no tumor, em um caso *simplex* (único, sem história familiar) de SL<sup>(79)</sup>. Alguns outros casos foram descritos posteriormente, nos quais verificou-se densa metilação de uma grande ilha CpG no promotor de um dos alelos do *hMLH1* em seus tecidos normais. Esse fenômeno ocorre na ausência de mutações no gene e, por isso, não pode ser identificado através do sequenciamento convencional. O espectro fenotípico é o mesmo daqueles indivíduos que possuem mutação no gene e também estão presentes MSI e perda da imunexpressão das proteínas MMR na IHQ<sup>(79-87)</sup>.

Por definição, epigenética é um termo que se aplica a um fenômeno reversível, e o que geralmente se observa é a presença da epimutação em todos os tecidos. O que se espera é que essa epimutação seja revertida ao estado normal durante a fertilização da próxima geração, quando o zigoto sofre uma reprogramação epigenética (posteriormente as células que originam a linhagem germinativa do embrião também sofrem nova reprogramação)<sup>(88)</sup>. Contudo, complicando um pouco mais o diagnóstico e aconselhamento genético na SL, em 2007, foi documentado e descrito um caso no qual uma mãe com SL e MMR epimutação, transmitiu esta última para um de seus três filhos. O detalhe importante é que os outros dois herdaram o mesmo alelo materno, mas neles a

epimutação foi corretamente reprogramada e “zerada”. No filho afetado, foram testados ainda seus espermatozóides e verificado que a epimutação já não estava mais presente<sup>(89-91)</sup>.

Apesar de conferir um risco de câncer semelhante ao dos casos de SL com mutação gênica, a epimutação de *hMLH1* não costuma estar associada a uma história familiar, ou seja aparentemente, ela não acomete famílias que preenchem critérios de Amsterdã. Por essa razão, foi proposto que essa causa deve ser buscada apenas em indivíduos selecionados que possuam CCR em idade muito jovem, tumor com MSI e perda da imunexpressão de *hMLH1* na IHQ e cujo sequenciamento tenha sido normal. O acompanhamento desses pacientes deve ser semelhante aos daqueles com mutação. O risco de transmissão parece ser menor, mas com a descrição desse caso específico de transmissão mãe-filho, esse cenário se tornou complexo para o aconselhamento genético<sup>(81,83,85,86,89,90,92)</sup>.

Uma outra epimutação na SL foi descrita em 2006, desta vez acometendo o *hMSH2*<sup>(93)</sup>. Uma família na qual indivíduos de três gerações apresentavam SL, com perda da imunexpressão de *hMSH2* e sem mutação no gene. Se no caso da epimutação de *hMLH1*, a metilação do promotor estava presente uniformemente em todos os tecidos normais, aqui os níveis de metilação variavam em diferentes tecidos normais, de aproximadamente 3% em sangue periférico, até 40% no epitélio normal do cólon. Além disso, a epimutação de *hMSH2* segregava juntamente com o alelo afetado e a doença era transmitida em um padrão autossômico dominante por três gerações, implicando algum defeito genético em *cis*. Posteriormente, esse padrão de transmissão foi identificado como sendo causado por deleções terminais no gene *EPCAM* (gene que em publicações mais antigas era denominado *TACSTD1*), localizado imediatamente acima do *hMSH2*. Essas deleções causam a extensão da transcrição do *EPCAM* pelo *hMSH2*, levando a uma metilação do promotor do *hMSH2*. Isso ocorre predominantemente em tecidos epiteliais onde há maior expressão do *EPCAM*, o que explica os níveis diferentes de metilação<sup>(93-101)</sup>.

A existência de cinco genes (incluindo o *EPCAM*) que direta ou indiretamente predisõem à síndrome e a descrição de alterações epigenéticas, inclusive herdáveis, revelam que a SL é uma doença de etiologia complexa que apenas agora começa a ser melhor compreendida.

#### 1.2.6- Fenótipos e correlações genótipo-fenótipo na SL

As características bioquímicas das proteínas MMR possuem implicações que refletem clinicamente, seja nas manifestações da doença, seja na interpretação dos testes diagnósticos.

A forma típica da SL é aquela de uma história familiar que chama atenção pelo grande número de cânceres colorretais, de endométrio e de outros sítios, de início em idade jovem. Os CCR ocorrem no cólon direito em 70% das vezes, com idade média de apresentação aos 45 anos. O risco para o CCR é de 70% aos 70 anos em séries realizadas em clínicas de alto risco<sup>(27)</sup>. Para o câncer de endométrio, o risco é situado entre 27-60% e a idade média de diagnóstico é de 59 anos<sup>(102)</sup>. Para os cânceres de estômago, ureter, pelve renal, intestino delgado, ductos biliares e cérebro, o risco cumulativo vital é estimado em torno de 10%. Esses são os riscos considerados quando ocorrem mutações nos genes *hMLH1* ou *hMSH2*<sup>(27)</sup>.

Com base na interação biológica das proteínas MMR pode-se explicar parte da variabilidade fenotípica da SL. Mutações nos dois genes mais importantes (*hMLH1* e *hMSH2*) resultam na forma clássica da SL, com a presença, na família, do amplo espectro de tumores, de início em idade jovem e com presença de MSI-H.

As mutações no *hMSH2* geralmente levam a perda de imunexpressão de MSH2 e MSH6 na IHQ dos CCR. Em sua maioria elas criam códons de parada (*stop codons*) prematuros, alterações nos sítios de *splicing*, grandes deleções ou rearranjos que levam a ausência de expressão. As deleções dos éxons de 1-6 são

comuns<sup>(50)</sup>. Um resumo proveniente do banco de dados do InSiGHT é mostrado no Quadro 7.

**Quadro 7-** Tipos de mutações nos genes do sistema MMR<sup>(51)</sup>

	<i>hMSH2</i>	<i>hMSH6</i>	<i>hMLH1</i>	<i>hPMS2</i>
Inserções	28 (2)	18 (6)	34 (5)	3 (2)
Deleções	280 (37)	118 (25)	303 (42)	34 (9)
Duplicações	74 (7)	57 (18)	778 (4)	8 (1)
Missense	221	161	289	29
Nonsense	107	55	92	18
Splice	16	8	51	9

( ) mutações localizadas em introns, 3UTR e 5UTR

Por sua vez, as mutações no *hMLH1* são menos homogêneas. Deleções e códons de parada são comuns, e levam a perda da imunexpressão na IHQ, contudo, comparado ao *hMSH2*, esse gene apresenta um maior número de mutações de sentido trocado (*missense*), algumas das quais podem ter imunexpressão normal. Uma pista para essas situações é que pode haver perda da imunexpressão de PMS2 e certamente haverá MSI<sup>(50)</sup>.

As mutações em *hMSH6* levam a uma manifestação mais tardia, apesar de também existir alto risco para câncer. Os tumores podem apresentar MSI-L, MSS ou MSI-H<sup>(27,50)</sup>. Mutações nesse gene conferem o mais alto risco para o câncer de endométrio na SL (70%), mas um risco menor para os demais cânceres relacionados à síndrome<sup>(102)</sup>. Para o CCR o risco aos 70 anos é de 22% para homens e 10% para mulheres<sup>(103)</sup>. O risco de outros tumores em homens situa-se em 3%, enquanto para mulheres (excluindo endométrio e CCR) em 11%<sup>(27)</sup>. Presumivelmente, a proteína MSH3 deve interagir com MSH2 e retardar o quadro, tornando o fenótipo mais tardio<sup>(50)</sup>.

Da mesma forma, as mutações em *hPMS2* levam a um fenótipo de menor gravidade, porém, desafiador do ponto de vista diagnóstico. Geralmente está associado a história familiar pouco expressiva e a câncer de início tardio. Na IHQ, ocasionam perda da imunopreservação de PMS2 e manutenção das demais proteínas, confundindo com algumas mutações *missense* de *hMLH1* que podem causar o mesmo padrão<sup>(63,104-108)</sup>. Além disso, foram descritos casos com perda de imunopreservação de PMS2, MSH2 e (ou) MSH6 causados por mutações no *hPMS2*<sup>(109)</sup>. Também foi sugerido que os tumores podem ter MSI-L<sup>(51)</sup>. Um estudo de pacientes que tinham tumores típicos da SL com perda da imunopreservação de PMS2 na IHQ demonstrou que 66% tinham mutação no gene *hPMS2*. Apenas 9% dos que tinham mutação preenchiam critérios de Amsterdã e 65,5% de Bethesda<sup>(27)</sup>. Para esse gene, a penetrância para CCR aos 70 anos é estimada em 15% para homens e 21% para as mulheres, com idade média de diagnóstico aos 61 e 64 anos, nos casos triados na população, e de 47 e 63 quando selecionados em instituições hospitalares. Para o câncer de endométrio, o risco é de 8-16% com idade média de 49 e 52 anos para pacientes triadas na população e em instituições hospitalares, respectivamente<sup>(63)</sup>.

#### 1.2.7- Variantes fenotípicas

Duas variantes fenotípicas são importantes de serem mencionadas. A primeira delas é a chamada síndrome de Muir-Torre, que não é uma síndrome, no sentido genético, tratando-se apenas de casos de SL nas quais os tumores típicos da SL ocorrem em conjunto com tumores sebáceos (benignos ou malignos). Esses casos são mais comuns nas mutações de *hMSH2*, mas também foram descritos com *hMLH1* e *hMSH6*, não constituindo uma síndrome à parte, mas apenas um fenótipo às vezes referido por esse nome<sup>(27)</sup>.

A síndrome de Turcot, segunda variante fenotípica, possui um histórico complicado, e também é apenas um fenótipo da SL. Em 1959, Turcot relatou um casal de irmãos com a associação de polipose adenomatosa familiar e tumores de

sistema nervoso central<sup>(110)</sup>. Apesar de não ter sido o primeiro a descrever essa associação de tumores, ela acabou ficando conhecida pelo seu nome depois que McKusick batizou essa condição com o nome de “síndrome de Turcot”, sugerindo-lhe um padrão de herança autossômico recessivo<sup>(111)</sup>.

Como a definição de polipose sempre teve um ponto de confusão no número de pólipos que a definem (hoje o fenótipo clássico é definido por 100 ou mais pólipos), vários casos da síndrome de Turcot, então descritos, tinham desde um único pólipo intestinal até a polipose clássica. Convém lembrar que a SL não era amplamente aceita como entidade clínica distinta até a identificação de sua causa genética no início dos anos 1990. Naquela época, também já se percebia haver um fenótipo de polipose adenomatosa familiar atenuada (com menos de 100 pólipos), abrindo espaço a controvérsias, principalmente considerando o sugerido padrão autossômico recessivo que contrastava com os casos típicos de PAF (com padrão autossômico dominante). Portanto, a síndrome de Turcot, seria ou não uma heredopatia à parte? Na década de 1980, ela chegou a ser subdividida em três tipos por dois autores diferentes, um dos quais propunha que tratava-se da PAF, o outro defendia que tratava-se de uma entidade clínica distinta<sup>(112,113)</sup>.

Aumentando a confusão, ela ganhou um outro nome: *brain tumor polyposis syndrome (BTP)*. No final da década de 1990 baseando-se nas características epidemiológicas, foi proposta nova classificação em dois grupos. O primeiro, denominado “síndrome BTP tipo 1”, era formado por pacientes que tinham gliomas antes dos 20 anos, adenomas (mas não caracterizavam polipose), apresentavam “erros de replicação”, como era chamada a MSI naquela época, e exibiam excesso de casos de consanguinidade, sugerindo herança autossômica recessiva. O segundo grupo, denominado “síndrome BTP tipo 2”, era formado por pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF) que tinham também tumor de sistema nervoso central. Paraf et al.<sup>(114)</sup> concluíram que o tipo 2 era a própria PAF, e que o tipo 1 talvez pudesse ter alguma correlação com a SL, tendo inclusive identificado mutação no gene *hPMS2* em um dos casos. Para eles o tipo 1

correspondia ao caso descrito originalmente por Turcot e chamaram o tipo 1 de verdadeira síndrome de Turcot<sup>(114)</sup>.

Hoje, sabe-se que uma parte dos casos dessa associação de tumores são de fato casos de SL, mas uma outra parte são casos de PAF<sup>(27)</sup>. Portanto, apesar da confusão dos nomes, que ainda persiste em alguns artigos na literatura, como se verá a seguir, do ponto de vista genético-clínico a “síndrome de Turcot” é apenas um fenótipo, não havendo razão para considerá-la uma síndrome propriamente dita.

### **Variante fenotípica com mutações bialélicas**

Complicando um pouco mais o “cenário fenotípico”, em 1999, dois grupos diferentes descreveram um quadro clínico semelhante em indivíduos que tinham deficiência no gene *hMLH1*. Na França, Wang et al.<sup>(115)</sup> descreveram em uma genealogia com diagnóstico de síndrome de Lynch, um núcleo familiar consanguíneo no qual duas irmãs tiveram câncer ainda na infância. A primeira delas faleceu aos dois anos de idade em razão de um linfoma não Hodgkin e a segunda teve leucemia mieloide aguda aos seis anos e meduloblastoma aos sete. Chamava atenção o fato de as duas possuírem características clínicas de neurofibromatose tipo 1: a primeira tinha manchas café-com-leite (MCL) em um hemitorço e pseudoartrose de tibia e a outra tinha múltiplas MCL e neurofibromas dérmicos. Nenhum outro membro da família tinha características de neurofibromatose<sup>(115)</sup>.

O outro grupo, na Turquia, descreveu uma família, na qual três irmãos, filhos de um casamento consanguíneo, desenvolveram leucemia mielóide crônica aos 12 meses, linfoma não Hodgkin aos 39 meses e leucemia aguda aos 24 meses. Duas dessas crianças apresentavam características de neurofibromatose tipo 1<sup>(116)</sup>.

No ano seguinte De Rosa et al.<sup>(117)</sup> descreveram um casal não consanguíneo, sem história familiar de câncer, que tiveram duas filhas com câncer. A primeira teve um oligodendroglioma aos 14 anos e um carcinoma de cólon aos 18. A segunda teve diagnóstico de neuroblastoma aos 13 anos. Ambas possuíam mutações em heterozigose composta no gene *hPMS2*.

Até 2013, somando os relatos mais recentes, existem descritas 67 famílias e 119 pacientes com mutações bialélicas, em homozigose ou heterozigose composta, nos genes *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* ou *hPMS2*. Esse número pode não ser preciso, devido a um mesmo caso ser relatado mais de uma vez, ou ao uso de diferentes nomenclaturas para descrever o quadro clínico. A apresentação clínica dessas famílias têm sido variável, mas hoje está claro que ocorre todo o espectro de tumores da SL monoalélica, com a diferença que tendem a ocorrer em uma idade muito mais jovem, a partir da primeira década de vida, ainda na infância, adolescência, ou na faixa dos 20 anos de idade, e que alguns tumores pouco vistos na forma monoalélica aqui ocorrem com mais frequência. Os tumores de sistema nervoso central (SNC) e os tumores gastrintestinais são os mais comuns (geralmente associados a mutações em *hPMS2* ou *hMSH6*), seguido pelos tumores hematológicos (geralmente associados a mutações nos genes *hMLH1* ou *hMSH2*). Ao que parece, a gravidade clínica parece ter correlação com o efeito da mutação na função proteica<sup>(118)</sup>.

Os indivíduos com mutações *hPMS2* ou *hMSH6* tendem a ter maior sobrevida, costumam apresentar um segundo tumor primário e desenvolvem tumores típicos da SL. Por sua vez, os pacientes com mutações em *hMLH1* ou *hMSH2* possuem incidência de tumor em idade mais precoce e sobrevida menor, o que talvez explique não desenvolverem tumores típicos da SL (uma vez que ocorrem em idade mais tardia) ou apresentarem menor incidência de múltiplos tumores primários (pela mesma razão). A partir dos casos relatados na literatura, foram compiladas as Tabelas 1, 2, 3 e 4, que descrevem os tumores e as idades médias de diagnóstico<sup>(63,115-117,119-172)</sup>.

**Tabela 1-** Tumores do SNC em pacientes com mutações bialélicas

<b>Tumor</b>	<b>n (%)</b>	<b>Média de Idade (Intervalo) em anos</b>
Gliomas	47 (71,2%)	11,6 (2-35)
PNET	6 (9,1%)	7,8 (4-14)
Meduloblastoma	4 (6,1%)	7 (6-8)
Outros/SOE	9 (13,6%)	20,7 (4-38)
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>11,7 (2-38)</b>

**PNET**-*Primitive neuroectodermal tumor* - tumor neuroectodérmico primitivo

**SOE**-sem outras especificações

**Tabela 2-** Tumores hematológicos em pacientes com mutações bialélicas

<b>Tumor</b>	<b>n (%)</b>	<b>Média de Idade (Intervalo) em anos</b>
Linfomas	22 (51,2%)	11,7 (1-14)
Leucemias	21 (48,8%)	7,6 (1-21)
<b>TOTAL</b>	<b>43</b>	<b>6,1 (1-21)</b>

**Tabela 3-** Tumores gastrintestinais em pacientes com mutações bialélicas

<b>Tumor</b>	<b>n (%)</b>	<b>Média de Idade (Intervalo) em anos</b>
Colorretais	48 (72,7%)	18,8 (8-48)
Duodeno	8 (12,1%)	23 (11-41)
Jejuno	7 (10,6%)	28,7 (15-42)
Íleo	3 (4,5%)	35 (30-39)
<b>TOTAL</b>	<b>66</b>	<b>21 (8-48)</b>

**Tabela 4-** Outros tumores em pacientes com mutações bialélicas

<b>Tumor</b>	<b>n</b>	<b>Média de Idade (Intervalo) em anos</b>
Endométrio	6	30,1 (23-44)
Sistema Urinário	2	18 (15-21)
Tumor de Wilms	1	4 (4)
Sarcomas	3	22 (2-61)
<b>TOTAL</b>	<b>12</b>	

Em seu conjunto, os tumores de SNC são o segundo grupo de maior incidência em crianças, ficando atrás apenas dos tumores, contudo, são os líderes de mortalidade. A Organização Mundial da Saúde (OMS) os classifica em quatro graus progressivos de gravidade e prognóstico<sup>(173,174)</sup>.

Ao que parece, portanto, na forma bialélica da SL há uma modificação na epidemiologia dos tumores. Aqueles tumores mais comuns na infância (hematológicos) frequentemente ocorrem em associação com mutações nos principais genes do sistema MMR (*hMLH1* e *hMSH2*), e causam maior mortalidade. Por outro lado, tumores que já são frequentes na faixa etária infantil (SNC) tornam-se mais comuns que o esperado e ocorrem em associação com mutações nos genes secundários do sistema MMR (*hMSH6* e *hPMS2*)<sup>(63,115-117,119-172)</sup>.

Também ficou evidente, nos últimos dois anos, que em várias famílias ocorrem pólipos adenomatosos no trato gastrointestinal, com casos descritos a partir de seis anos de idade<sup>(148,149,166)</sup>. Em alguns pacientes, em torno de 20 anos de idade, o número de pólipos já se encontra na casa das dezenas, sendo suficiente para incluir a variante bialélica da SL como diagnóstico diferencial da forma atenuada da polipose adenomatosa familiar. Em uma família o número de pólipos era superior a 100, o que leva ao questionamento se não haveria mutação concomitante no gene *APC*<sup>(163)</sup>.

Além dos cânceres, é frequente os indivíduos acometidos apresentarem pelo menos uma MCL, 79 dos 119 pacientes relatados (66,4%) apresentavam esse tipo de lesão, mas um número bem menor apresentava múltiplas MCL (26,8%) (dados compilados a partir de todos os relatos, já citados). Em 21 pacientes (17,6%), algum outro sinal clínico de neurofibromatose tipo 1, como efélides axilares, neurofibromas ou nódulos de Lisch estavam presentes. Foi demonstrado que o gene dessa doença (*NF1*) pode ser alvo de mutações em consequência da instabilidade de microssatélites<sup>(121)</sup>. Esse fato levanta possibilidades de que alguns dos casos *de novo* de neurofibromatose tipo 1 talvez sejam causados por mutações bialélicas nos genes do sistema MMR. De fato, alguns dos casos relatados haviam sido acompanhados ou encaminhados a clínicas de neurofibromatose.

Outros sinais incluem presença de nevos e máculas hiper ou hipopigmentadas, agenesia de corpo caloso e heterotopia de substância cinzenta no SNC<sup>(171)</sup>. Vindo ao encontro do que se sabe sobre a função do sistema MMR, recentemente foi ainda descrita a ocorrência de imunodeficiências relacionadas à produção de imunoglobulinas, que ainda é pouco caracterizada nas famílias<sup>(171,175)</sup>.

Portanto, o quadro clínico das variantes com mutações bialélicas corresponde a uma expressão mais grave da SL clássica. Curiosamente, em função dos relatos históricos da síndrome de Turcot, em função da proporção maior de casamentos consanguíneos e das mutações bialélicas com recorrência nas irmandades, tem sido atribuído a esse quadro clínico um padrão autossômico recessivo. Desde sua descrição em 1999, complicando a nomenclatura, alguns nomes diferentes foram sugeridos incluindo o acrônimo CoLoN (***Colon tumours and/or Leukaemia/Lymphoma and/or Neurofibromatosis features***)<sup>(176)</sup>, síndrome de Lynch III (em alusão a uma antiga classificação, em desuso, que dividia os pacientes com SL em: SL tipo 1, quando havia apenas CCR na família, e SL tipo 2, quando na família havia CCR e tumores extra-cólicos)<sup>(177)</sup>, síndrome de câncer infantil (*CCS - childhood cancer syndrome*)<sup>(150)</sup> e,

mais recentemente, síndrome da deficiência constitucional de MMR (síndrome CMMR-D, *constitutional MMR deficiency syndrome*)<sup>(157)</sup>, desses, o que parece ainda estar sendo utilizado.

#### 1.2.8- Justificativa

No Brasil, não foram encontrados relatos do quadro clínico de mutações bialélicas nas bases de dados científicas do MEDLINE e do LILACS. Ressalve-se, entretanto, que no momento da redação final do presente trabalho, uma família de Santa Catarina, por meio telefônico, contactou o serviço de Oncopediatria do Hospital de Câncer de Barretos relatando que os três filhos tiveram a síndrome, dois já falecidos por câncer de SNC e um terceiro atualmente em tratamento devido a glioblastoma multiforme na infância, com mutações diagnosticadas.

Considerando o pouco conhecimento sobre a prevalência das mutações nos genes do sistema MMR no Brasil e, ainda, o risco de recorrência da forma bialélica da SL nas famílias acometidas, seu estudo é importante do ponto de vista clínico e de aconselhamento genético. Tendo em vista a necessidade de melhorar essa lacuna no conhecimento da SL no Brasil, a forma bialélica dessa heredopatia foi o objeto da pesquisa aqui apresentada.





## **2- OBJETIVOS**

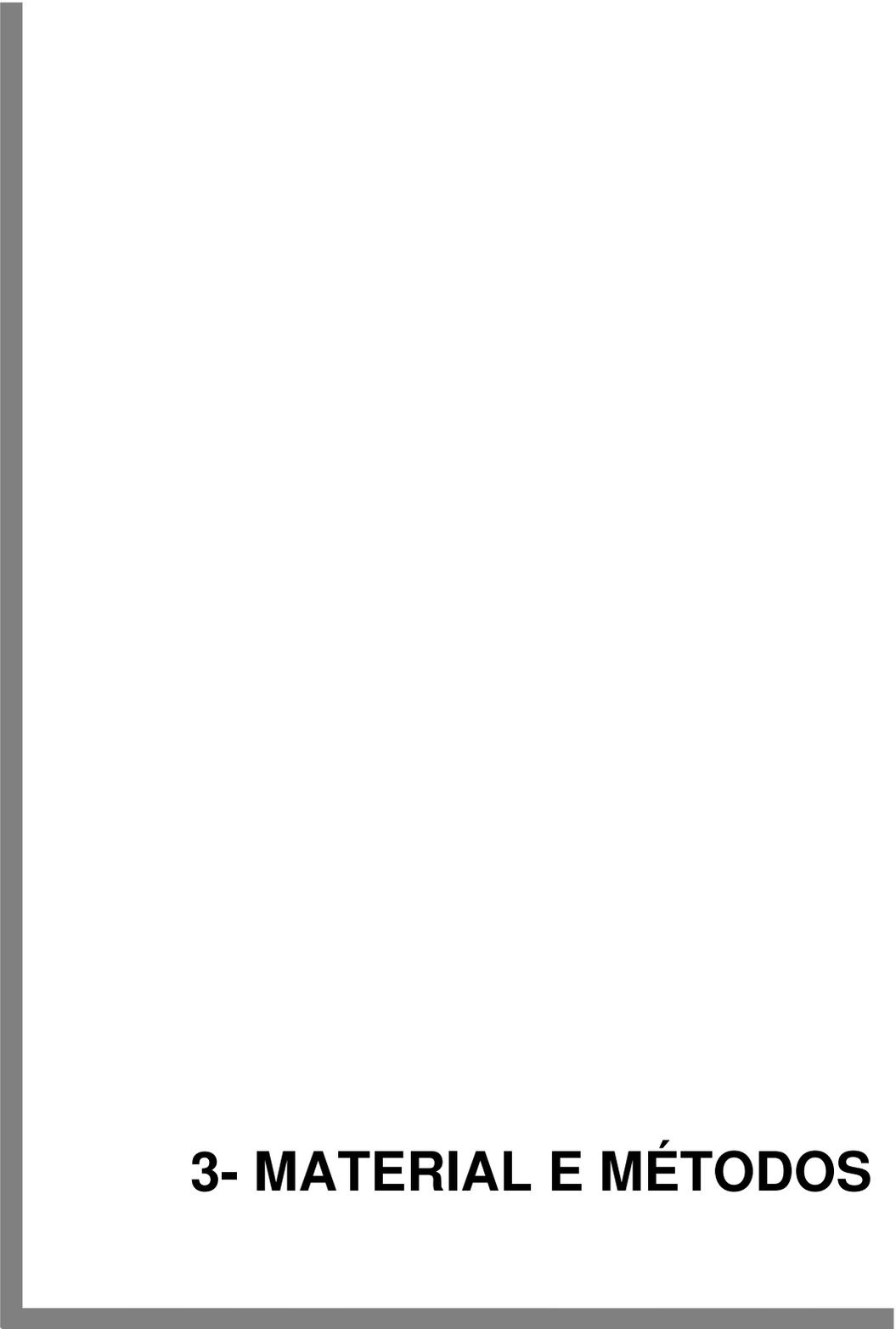


Este estudo teve por objetivo geral identificar e caracterizar mutações bialélicas nos genes do sistema MMR em pacientes com tumor de sistema nervoso central, com instabilidade de microssatélites tumoral, atendidos no Hospital de Câncer de Barretos.

Como objetivos específicos propôs-se:

- 1-** identificar os indivíduos com sinais de instabilidade de microssatélites e analisar a prevalência dessa alteração em pacientes pediátricos e adultos jovens com tumor de sistema nervoso central;
- 2-** determinar o genótipo dos indivíduos com instabilidade de microssatélites tumoral, identificando possíveis mutações deletérias nos genes do sistema MMR;
- 3-** determinar a frequência de mutações deletérias na amostra estudada; e
- 4-** correlacionar o quadro clínico com o genótipo e a história familiar nos indivíduos com mutações deletérias identificadas.





## **3- MATERIAL E MÉTODOS**



### 3.1- Casuística

O estudo foi realizado com pacientes atendidos no Hospital de Câncer de Barretos (HCB), uma unidade conveniada ao Sistema Único de Saúde, localizado no município de Barretos, a noroeste da capital do Estado de São Paulo, especializado no atendimento a pessoas com câncer e cujos pacientes são oriundos de todas as regiões brasileiras, principalmente dos estados de São Paulo, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso e Rondônia. É uma unidade de alta complexidade, que conta com serviço de patologia capacitado com técnicas de diagnóstico molecular. Possui, ainda, uma unidade hospitalar voltada exclusivamente ao público infantil e um Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular, dotado de laboratórios de biologia e genética moleculares, onde foram realizadas as análises da presente pesquisa.

O estudo foi do tipo retrospectivo, em uma série de 92 pacientes cuja classificação internacional de doenças (CID) no Registro Hospitalar de Câncer do HCB correspondia a tumores de SNC (CID C70 - C72), e que tinham idade ao diagnóstico variando de zero a 35 anos (inclusive). A escolha desses tumores se deveu ao fato deles serem os mais frequentes e os mais comumente encontrados nas formas bialélicas da síndrome. A faixa etária estabelecida é aquela na qual os relatos desse fenótipo terem sido associados a esses tumores. A análise foi limitada a pacientes cujo diagnóstico foi realizado no período compreendido entre os anos 2000 e 2011.

Foi realizada, ainda, busca no arquivo do Departamento de Patologia do HCB para determinar a disponibilidade de material tumoral para pesquisa de MSI. Treze pacientes não possuíam material suficiente para serem incluídos na pesquisa, sendo excluídos, restando 79 que tiveram amostras incluídas no estudo e testadas para MSI.

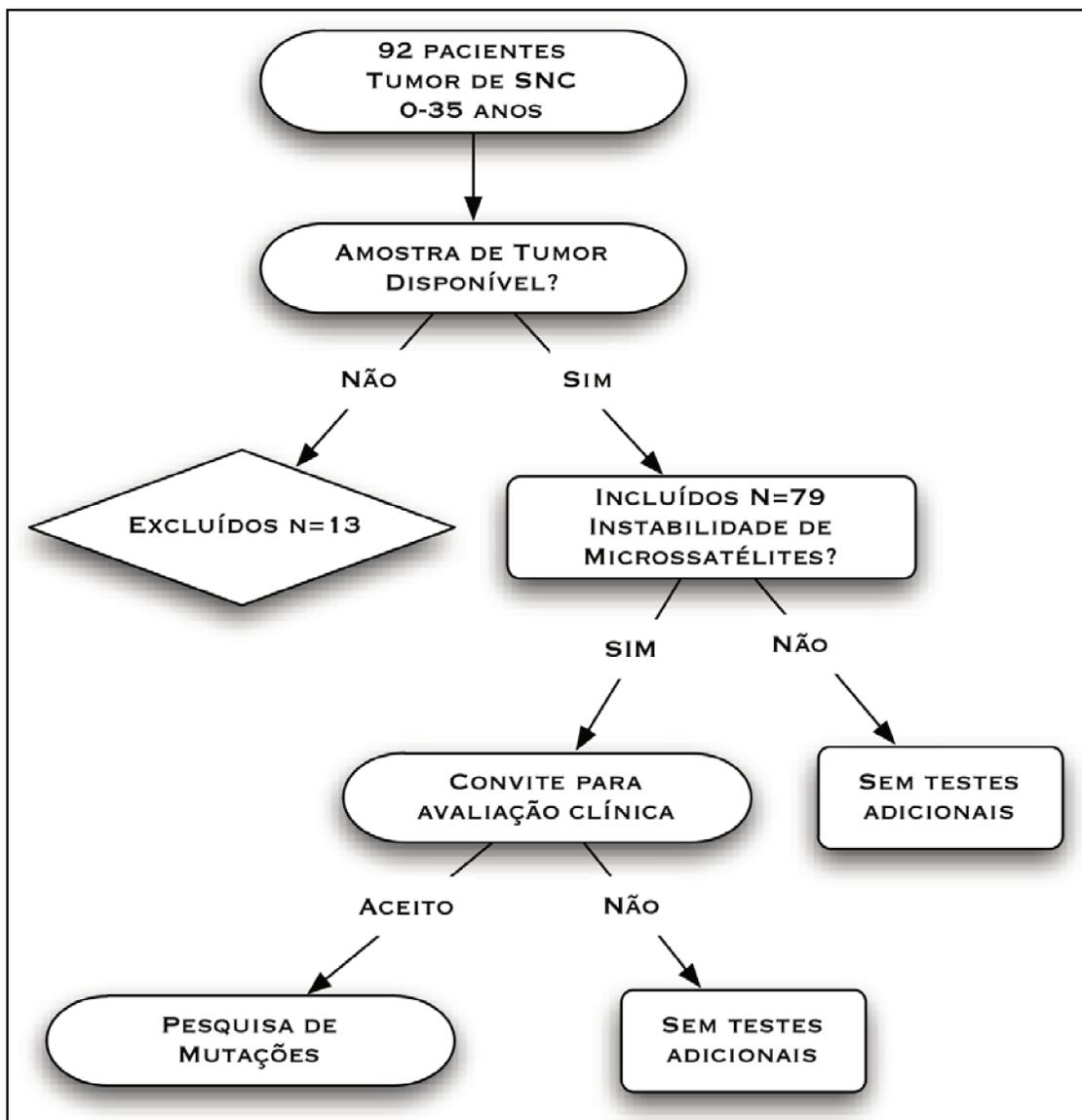
Os pacientes cujas amostras mostraram MSI-H ou MSI-L foram então contactados por telefone, ou em consulta de rotina na instituição, e convidados a participarem da segunda fase do estudo, que incluiu registro da história clínica e

familiar, exame físico e obtenção de sangue periférico para análise de mutações nos genes do sistema MMR.

No que diz respeito à história familiar dos pacientes, foram questionados o estado de saúde de cada membro da família, causa e idade da morte (quando fosse o caso); quando havia câncer, sítio e idade do tumor - procurando sempre registrar pelo menos três gerações. Para fins da presente pesquisa não foi requisitado nenhum tipo de comprovação ou registro médico de familiares. Partiu-se da premissa que a história contada pelos pacientes ou seus responsáveis estão corretas, conhecendo-se as limitações de tal premissa.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do HCB e foi obtido termo de consentimento livre e esclarecido dos pacientes que atenderam ao convite. Para os menores de idade, a autorização para participação foi obtida com seus responsáveis legais.

Um fluxograma resumindo as etapas da pesquisa pode ser visto na Figura 2.



**Figura 2-** Fluxograma das etapas do estudo

### 3.2- Extração do DNA tumoral e pesquisa de instabilidade de microsatélites

As 79 amostras de tumor estavam armazenadas em blocos de parafina. Para extração do DNA tumoral, inicialmente áreas do tumor eram cortadas em seções de 10µm de espessura, e em seguida desparafinadas e hidratadas em um processo seriado de extração de xileno e etanol em concentrações decrescentes

(100%, 70%, 50%). Quando presentes áreas de tecido normal e tumoral foi realizada microdissecção com agulha estéril (25G, 0,5mm). O DNA foi extraído utilizando-se o kit “QIAamp DNA Micro Kit” (Qiagen, Hilden, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. As amostras de DNA extraídas dos tumores eram congeladas a -20°C para uso subsequente.

Com o DNA tumoral já extraído, procedeu-se a pesquisa de instabilidade de microssatélites. Para essa finalidade foi realizada amplificação por meio da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR) *multiplex*, utilizando-se um painel composto de cinco marcadores de microssatélites com repetições de mononucleotídeos *quasi*-monomórficos (NR27, NR21, NR24, BAT25 e BAT26). As sequências inicializadoras (*primers*) usadas foram descritas previamente<sup>(178)</sup> (Tabela 5).

**Tabela 5-** Sequências inicializadoras (*primers*) na PCR *multiplex* para detecção de instabilidade de microssatélites<sup>(178)</sup>

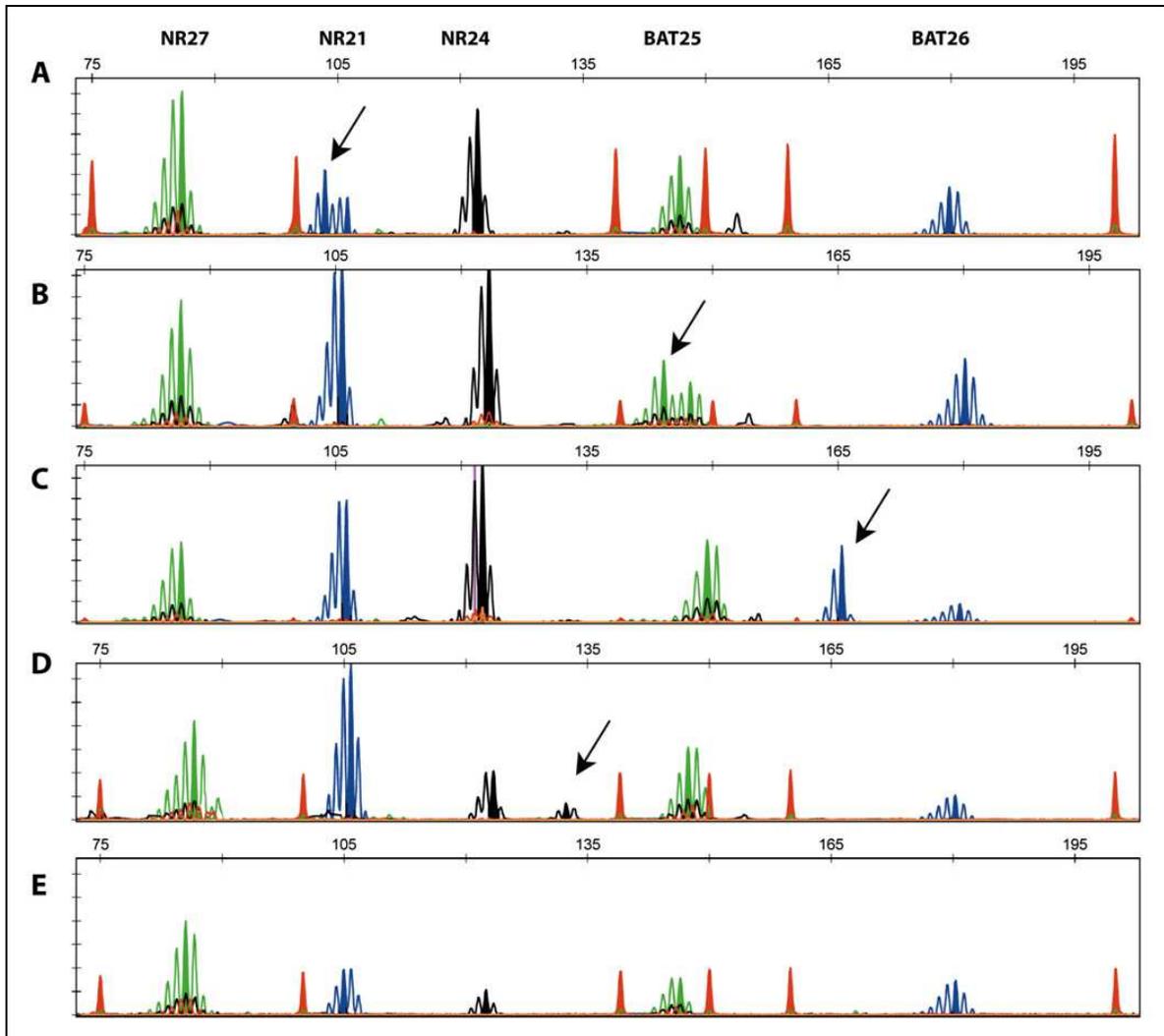
Marcador	Gene	Repetição	Primer (5' - 3')		Tamanho (pb)
			F	R	
BAT-26	<i>hMSH2</i>	26A intron 5	CTGCGGTAATCAAGTTTTTAG AACCATTCAACATTTTTAAACCC		183
BAT-25	<i>c-kit</i>	25T intron 16	TACCAGGTGGCAAAGGGCA TCTGCATTTTAACTATGGCTC		153
NR-24	<i>Zinc finger 2</i>	24 T 3'UTR	GCTGAATTTTACCTCCTGAC ATTGTGCCATTGCATTCCAA		131
NR-21	<i>SLC7A8</i>	21 T 5'UTR	GAGTCGCTGGCACAGTTCTA CTGGTCACTCGCGTTTACAA		109
NR-27	<i>inhibitor of apoptosis protein-1</i>	27 A 5'UTR	AACCATGCTTGCAAACCACT CGATAATACTAGCAATGACC		87

**F**=forward;

**R**=reverse;

**pb**=pares de base

Para a reação, cada sequência *primer antisense* foi previamente marcada com os corantes fluorescentes 6-carboxi-fluoresceína (FAM) para as sequências do BAT-26 e NR21, hexacloro-6-carboxifluoresceína (HEX) para as sequências do BAT-25 e NR-27, e com tetracloro-6-carboxifluoresceína (TET) para a NR-24. A amplificação *multiplex* foi realizada utilizando-se o *kit Qiagen Multiplex PCR Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), com 0,5µL de DNA em concentração de 50ng/µL e as seguintes condições de amplificação: 15 minutos a 95°C; 40 ciclos de 95°C por 30s, 55°C por 90s e 72°C por 30s, seguidos de uma extensão final 72°C por seis minutos. Os produtos da reação eram, então, separados em eletroforese capilar no sequenciador ABI 3500xL (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, EUA). Os resultados foram analisados com o *software GeneMapper v4.1* (Applied Biosystems/Life Technologies, Foster City, CA, EUA). O tamanho dos alelos foi comparado a um valor padrão pré-estabelecido, de forma a verificar a presença ou ausência de MSI. Era considerada instabilidade, para um determinado marcador, a presença de um alelo cujo tamanho variasse um ou mais pares de base em relação ao valor de referência máximo e mínimo para o marcador em questão. Foi considerada MSI-H a presença de instabilidade em três ou mais marcadores, MSI-L a presença de instabilidade em um ou dois marcadores, e MSS (estável) a ausência de instabilidade nos cinco marcadores, conforme previamente definido<sup>(74,76,178)</sup>. Os resultados típicos da presença de MSI nesta série podem ser vistos na Figura 3.



**A-** Exemplo de tumor com instabilidade no marcador NR21; **B-** Exemplo de tumor com instabilidade no marcador BAT25; **C-** Exemplo de tumor com instabilidade no marcador BAT26; **D-** Exemplo de tumor com instabilidade no marcador NR24; **E-** Controle normal

**Figura 3-** Exemplos de resultados da pesquisa de instabilidade de microssatélites (diferentes amostras de tumor)

### 3.3- Análise do DNA constitutivo

#### Extração do DNA de sangue periférico

Foram obtidos 10-20ml de sangue periférico dos pacientes que concordaram com a participação no estudo. Subsequentemente, o sangue foi submetido à extração de DNA utilizando-se o kit “*QIAamp DNA Micro Kit*” (*Quiagen*, Hilden, Alemanha), seguindo as especificações do fabricante. O DNA extraído foi quantificado (*NanoDrop - Thermo Fisher Scientific Inc*, Rockford, IL, EUA), diluído para uma concentração de uso de 50ng/μl e armazenado a -20°C até sua utilização.

#### Amplificação gênica e sequenciamento

Após a extração, as amostras de DNA foram utilizadas para a pesquisa de mutações germinativas ao longo de toda a extensão codificadora dos genes *hMLH1*, *hMSH2* e *hMSH6*, incluindo as regiões intrônicas flanqueadoras. A análise foi feita por sequenciamento direto e bidirecional do DNA, depois de realizada a amplificação por PCR.

Para amplificação dos genes *hMLH1* e *hMSH2* as condições foram: desnaturação a 95°C por 30s, anelamento variando de 55 a 58°C por 30s e extensão a 72°C por 30s, em 35 ciclos, utilizando-se as sequências de *primers* descritas por Kurzawski et al.<sup>(179)</sup> (Tabelas 6 e 7).

**Tabela 6-** Sequências inicializadoras (*primers*) para o gene *hMLH1*

EXON	Temp. de Anelamento (°C)	Primers (5' - 3')	
		F	R
1	55	AGGCACTGAGGTGATTGGC	
		TCGTAGCCCTTAAGTGAGC	
2	58	AATATGTACATTAGAGTAGTTG	
		CAGAGAAAGGTCCTGACTC	
3	58	AGAGATTTGGAAAATGAGTAAC	
		ACAATGTCATCACAGGAGG	
4	58	AACCTTTCCCTTTGGTGAGG	
		GATTACTCTGAGACCTAGGC	
5	58	GATTTTCTCTTTTCCCCTTGGG	
		CAAACAAAGCTTCAACAATTTAC	
6	58	GGGTTTTATTTTCAAGTACTTCTATG	
		GCTCAGCAACTGTTCAATGTATGAGC	
7	57	CTAGTGTGTGTTTTTGGC	
		CATAACCTTATCTCCACC	
8	57	CTCAGCCATGAGACAATAAATCC	
		GGTTCCCAAATAATGTGATGG	
9	58	CAAAGCTTCAGAATCTC	
		CTGTGGGTGTTTCCTGTGAGTGG	
10	58	CATGACTTTGTGTGAATGTACACC	
		GAGGAGAGCCTGATAGAACATCTG	
11	58	GGGCTTTTTCTCCCCCTCCC	
		AAAATCTGGGCTCTCACG	
12A	58	AATTATACCTCATACTAGC	
		GTTTGCTCAGAGGCTGC	
12B	58	GATGGTTCGTACAGATTCCCG	
		GTTTTATTACAGAATAAAGGAGG	
13	58	TGCAACCCACAAAATTTGGC	
		CTTTCTCCATTTCCAAAACC	
14	58	TGGTGTCTCTAGTTCTGG	
		CATTGTTGTAGTAGCTCTGC	
15	58	CCCATTTGTCCCAACTGG	
		CGGTCAGTTGAAATGTCAG	
16	58	CATTTGGATGCTCCGTTAAAGC	
		CACCCGGCTGGAAATTTTATTTG	
17	58	GGAAAGGCACTGGAGAAATGGG	
		CCCTCCAGCACACATGCATGTACC	
18	58	TAAGTAGTCTGTGATCTCCG	
		ATGTATGAGGTCCTGTCC	
19	58	GACACCAGTGTATGTTGG	
		GAGAAAGAAGAACACATCCC	

*F=forward;*

*R=reverse*

**Tabela 7-** Sequências inicializadoras (*primers*) para o gene *hMSH2*

EXON	Temp. de Anelamento (°C)	Primers (5' - 3')	
		F	R
1	56	GTCGCGCATTTCCTTCAACC	GCTGCTCACCGCCCACTCT
2	58	TTGAACATGTAATATCTCAAATCTGT	AAAGGAAGATAATTACCTTATATGC
3	58	TCAAGAGTTTGTTAAATTTTTAAAA	CTAGGCCTGGAATCTCCTCT
4	58	TTCCTTTTCTCATAGTAGTTTTAAA	TTGTAATTCACATTTATAATCCATG
5	58	CCAGATGGTATAGAAATCTTCG	CCATTCAACATTTTTAACCCTT
6	58	GCTTGCCATTCTTTCTATTTTATT	GCAGGTTACATAAACTAACGAAAG
7	55	CATTAATTCAAGTTAATTTATTTCA	AAAACAAAATCACTTGTTACCTTCA
8	58	TGAGATCTTTTTATTTGTTTGT	TTTGCTTTTTAAAATAACTACTGC
9	58	GGATTTTGTCACCTTGTTCTGTT	TCCAACCTCCAATGACCCAT
10	58	TGGAATACTTTTTCTTTTCTTCTT	GCATTTAGGGAATTAATAAAGGG
11	58	ATAAACTGTTATTTTCGATTTGCA	CCAGGTGACATTCAGAACATT
12	58	TTATTATTCAGTATTCCTGTGTACA	CCCACAAAGCCCAAAAACC
13	58	ATAATTTGTTTTGTAGGCCCC	TTTCTATCTTCAAGGACTAGGAG
14	58	CCACATTTTATGTGATGGGAA	CCAATAGTACATACCTTTCTTCACC
15	58	GTCCCCTCACGCTTCCC	AAACTATGAAAACAACTGACAAAC
16	58	AATGGGACATTCACATGTGTT	CCATGGGCACTGACAGTTAA

*F*=forward;

*R*=reverse

Para o gene *hMSH6* foram realizados desnaturação a 95°C por 30s, anelamento a 57,8°C por 30s e extensão a 72°C por 60s, e extensão final a 72°C por sete minutos, com os *primers* da Tabela 8, conforme Hegde et al.<sup>(180)</sup>.

**Tabela 8-** Sequências inicializadoras (*primers*) para o gene *hMSH6*

EXON	<i>Primers</i> (5' - 3')	
	<i>F</i>	<i>R</i>
1	TGTTGATTGGCCACTGGG	CAACCCCTGTGCGAGCCTC
2	TAAGTGCCTTTAAGGAACTTGACCA	TCATATAGAAAAAGTCTGCCTGTCTG
3	CTGGTCTTGAAGTCTGGGAT	CCCCTTTCTTCCCCATC
4A	TGCACGGGTACCATTATAAAGTCA	GTATTCTTGGTTTCTGATGAAATGCTAG
4B	GAAGGAAACGCCCTCAGC	CAGTTGCCTTTCATGAATACCAG
4C	CCACATGGATGCTCTTATTGGA	TCATCTGAAAAGTACCTATGAAAAGT
4D	TTTGTTGATACTTCACTGGGAAAGTT	CTCCTGATCAATAAGGCATTTTTTG
4E	CTTAGGTGGTTGTGTCTTCTACCTC	TGAGTAGCCTCTCAAGATCTGGAA
4F	CGAAGTTGTAGAGCTTCTAAAGAAGCT	GTCCTACAGCCAATTCTGTTGC
4G	AGCCTCCTGGAATACCTAGAGAAAC	ACTTATTTTTAGGGATAATATACAGCTGGC
5	CACTTAGGCTGATAAAACCCCC	GTATGTTATTCCTAATGTCACAAATGACTTT
6	AAGACAAAAGTTTATGAAAGTACTACCA	AGAAGCAAATATCTTTTATCACATCTAAATG
7	TAACCTAGAAGATGAATTTATGTAATATGATTT	TTCAGATAATCTTCTATAAAAATAGTTATTTGT
8	TGAGTTACTTCCTTATGCATATTTTACT	AATATTAGCGATACATGTGCTAGCA
9	TGCTAGCACATGTATCGCTAATATT	GCATCATCCCTTCCCCTTTTA
10	GAAGGGATGATGCACTATGAAAAA	GTAGAAGGTAGATAAGAATTAAGGGTTTAATTT

*F*=forward;

*R*=reverse

Após a reação de PCR foi realizada a purificação dos produtos de PCR com a utilização do *kit* USB<sup>®</sup> ExoSAP-IT (*Affimetrix*, Santa Clara, CA, EUA), conforme instruções do fabricante.

A reação de sequenciamento foi feita utilizando-se o “*BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit*” (*Applied Biosystems/Life Technologies*, Foster City, CA, EUA) no sequenciador ABI-3500xL (*Applied Biosystems/Life Technologies*, Foster City, CA, EUA). Os eletroferogramas foram então analisados com o auxílio do *software* *SeqScape* (*Applied Biosystems/Life Technologies*, Foster City, CA, EUA).

### **Pesquisa de rearranjos (MLPA)**

Para pesquisa de rearranjos, as amostras de DNA foram submetidas a técnica de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)*, conforme descrito por Gille et al.<sup>(181)</sup>.

Para o estudo foram utilizados os *kits* de MLPA *P-003-C1* e *P-072-C1* (*MRC-Holland<sup>®</sup>*, Amsterdã, Holanda). Os *mix* contêm sondas que detectam todos os éxons dos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, além do último éxon do gene *EPCAM*; o procedimento foi feito conforme as instruções do fabricante. A análise dos fragmentos foi feita em sequenciador capilar ABI3500xL (*Applied Biosystems/Life Technologies*, Foster City, CA, EUA).

### **Gene *hPMS2***

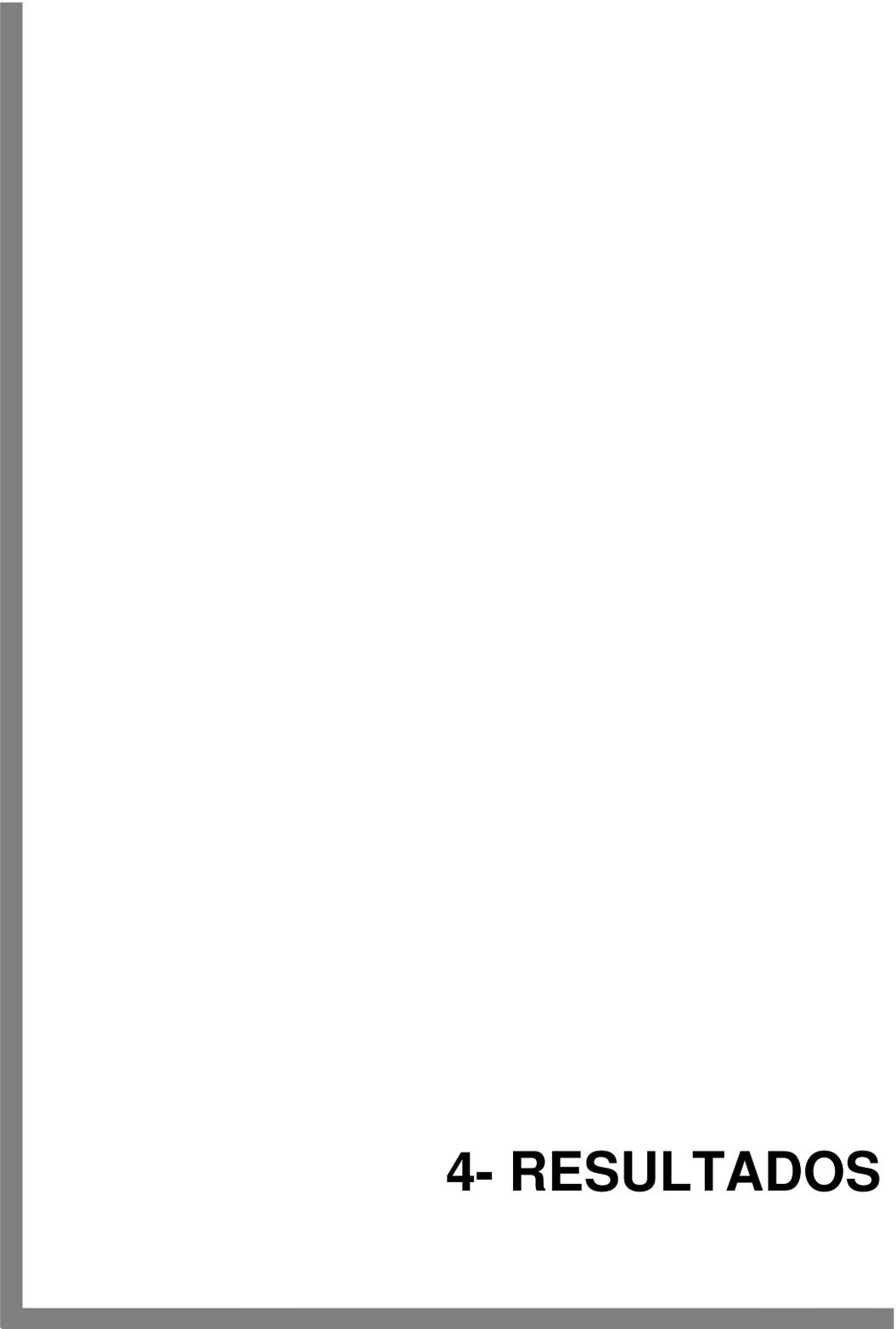
Não foram realizados o sequenciamento e a pesquisa de rearranjos do gene *hPMS2*. A existência de vários pseudogenes relacionados a esse *locus* ocasionou dificuldade técnica de amplificação sem a interferência das sequências homólogas. Esse ponto voltará a ser abordado na discussão.

## Comparação com base de dados

Uma vez finalizados os procedimentos de sequenciamento e MLPA, todas as variantes identificadas foram classificadas quanto ao seu potencial deletério e efeito clínico com auxílio de dados publicados na literatura e dos bancos de dados disponíveis no LOVD (*Leiden Open Variation Database*)<sup>3</sup>, em particular o *Colon Cancer Gene Variant Database (v2.0, Build 35)*. O LOVD tem por objetivo prover uma ferramenta gratuita para o depósito e busca de variantes genéticas em um banco de dados com gerenciamento. No caso do câncer de cólon, é gerenciado pelo InSiGHT e contém informação do *hMLH1*, *hMSH2*, *hMSH6* e outros genes relacionados ao CCR hereditário<sup>(182-184)</sup>.

---

<sup>3</sup>[www.lovd.nl](http://www.lovd.nl)



## **4- RESULTADOS**



#### 4.1- Primeira fase - pesquisa de MSI

Os 79 tumores analisados para presença de MSI, em função da origem do tumor, foram separados em dois grandes grupos, o dos meduloblastomas (n=37) e o dos gliomas (n=42) (independente do grau).

A idade média dos pacientes com meduloblastoma foi de 13,6 anos (variando de dois a 35 anos) e desvio padrão (DP) de 9,112. Desses 37 pacientes, 21 (56,8%) eram do sexo masculino, com idade média de 12,1 anos (variando de dois a 28 anos; DP=9,192), e 16 (43,2%) do sexo feminino, com idade média de 15,6 anos (variando de dois a 35 anos; DP=8,891) (Tabela 9). Não houve diferença significativa de distribuição entre sexos ou de idade média entre os sexos ( $p>0,05$ ).

**Tabela 9-** Proporção de meduloblastomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo

<b>Sexo</b>	<b>n (%)</b>	<b>Idade Média (intervalo), em anos</b>
<b>Masculino</b>	21 (56,8%)	12,1 (2-28)
<b>Feminino</b>	16 (43,2%)	15,6 (2-35)
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>13,6 (2-35)</b>
	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>

$$\chi^2=0,676; t=1,174$$

A idade média do grupo dos pacientes com glioma foi de 21,5 anos (variando de três a 35 anos; DP=9,920), sendo 30 (71,4%) do sexo masculino, com idade média de 20,8 anos (variando de três a 35 anos; DP=10,662) e 12 (28,6%) do sexo feminino, com idade média de 23,2 (variando de nove a 32 anos; DP=7,918) (Tabela 10). Houve diferença significativa para a razão de sexo ( $p<0,05$ ). Não houve diferença significativa de idade média entre os sexos ( $p>0,05$ ).

**Tabela 10-** Proporção de gliomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo

<b>Sexo</b>	<b>n (%)</b>	<b>Idade Média (intervalo), em anos</b>
<b>Masculino</b>	30 (71,4%)	20,8 (3-35)
<b>Feminino</b>	12 (28,6%)	23,2 (9-32)
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>21,5 (3-35)</b>
	<b>p&lt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>

$$\chi^2=7,71; t=0,694$$

Ao exame histopatológico dos gliomas analisados, 26 eram de baixo grau (média de idade de 18,5 anos, variando de três a 33) e 16 de alto grau (média de idade de 26,4 anos, variando de dez a 35 anos). Não houve diferença significativa de distribuição entre os dois grupos ( $p>0,05$ ). Houve diferença significativa de idade entre os dois grupos ( $p<0,05$ ) (Tabela 11).

**Tabela 11-** Proporção de gliomas de baixo e de alto grau e sua idade média ao diagnóstico

<b>Gliomas</b>	<b>n (%)</b>	<b>Idade Média (intervalo), em anos</b>
<b>Baixo grau</b>	26 (61,9%)	18,5 (3-33)
<b>Alto grau</b>	16 (38,1%)	26,4 (10-35)
<b>Total</b>	<b>42</b>	<b>21,5 (3-35)</b>
	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&lt;0,05</b>

$$\chi^2=2,38; t=-3,014$$

### Instabilidade de microssatélites

Do grupo dos gliomas, sete (17,5%) apresentaram MSI-L (cinco entre os de baixo grau, dois entre os de alto grau), enquanto no grupo dos meduloblastomas foram encontrados oito (22,2%) MSI-L (Tabelas 12 e 13). Em nenhum dos grupos foi encontrado MSI-H. O *status* individual dos pacientes pode ser visto nas Tabelas 16 e 17. Na Tabela 18 são apresentados os tamanhos dos alelos dos pacientes que tinham MSI-L.

**Tabela 12-** Pacientes com MSI no grupo dos gliomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo

Sexo	n (%)	Idade Média (intervalo), em anos
Masculino	4 (13,8%)*	16,8 (4-27)
Feminino	3 (27,3%)*	22,7 (9-32)
<b>Total</b>	<b>7 (17,5%)*</b>	<b>19,3 (4-32)</b>
	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>

\*excluídos para efeito de cálculo, um paciente de cada sexo, nos quais não houve amplificação.

$\chi^2=0,287$ , com a correção de Yates,  $t=0,692$

**Tabela 13-** Pacientes com MSI no grupo dos meduloblastomas e sua idade média ao diagnóstico, por sexo

Sexo	n (%)	Idade Média (intervalo), em anos
Masculino	2 (9,5%)	9 (2-16)
Feminino	6 (40%)	13 (12-24)
<b>Total</b>	<b>8 (22,2%)</b>	<b>9,9 (2-24)</b>
	<b>p&gt;0,05</b>	<b>p&gt;0,05</b>

\*excluídos para efeito de cálculo, um paciente de cada sexo, nos quais não houve amplificação

$\chi^2=3,104$  com a correção de Yates;  $t=0,519$

**Tabela 14-** Proporção de gliomas com MSI-L, divididos por faixa etária

<b>Faixa etária</b>	<b>MSI-L (%)</b>	<b>MSS</b>
<b>0-23</b>	3 (16,7%)*	15*
<b>24-35</b>	4 (18,2%)*	18*
<b>Total</b>	<b>7 (17,5%)*</b>	<b>33*</b>

**p>0,05**

\*para o cálculo da proporção foram excluídos dois pacientes, um em cada grupo, por não ter havido amplificação de suas amostras

$$\chi^2=0,016$$

**Tabela 15-** Proporção de gliomas com MSI-L, divididos por grau OMS

<b>OMS</b>	<b>MSI-L (%)</b>	<b>MSS</b>
<b>Baixo grau</b>	2 (15,4%)*	13*
<b>Alto grau</b>	5 (25%)*	20*
<b>Total</b>	<b>7 (17,5%)*</b>	<b>33*</b>

**p>0,05**

\*para o cálculo da proporção foram excluídos dois pacientes, um em cada grupo, por não ter havido amplificação de suas amostras

$$\chi^2=0,289$$

**Tabela 16-** Status de MSI para os pacientes com glioma

<b>Paciente Nº</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status MSI</b>
G1	M	32	MSS
G2	M	16	MSS
G3	M	4	MSS
G4	F	9	NA
G5	M	9	MSS
G6	F	10	MSI-L
G7	M	10	MSS
G8	M	11	MSI-L
G9	M	21	MSS
G10	F	32	MSI-L
G11	M	26	MSS
G12	M	23	MSS
G13	F	27	MSS
G14	M	35	MSS
G15	F	21	MSS
G16	M	27	MSS
G17	M	19	MSS
G18	M	27	MSS
G19	M	33	MSS
G20	M	35	MSS
G21	F	26	MSI-L
G22	M	25	MSI-L
G23	M	27	MSI-L
G24	M	32	MSS
G25	F	29	MSS
G26	M	28	MSS
G27	M	33	MSS
G28	M	21	MSS
G29	M	27	MSS
G30	F	22	MSS

<b>Paciente Nº</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status MSI</b>
G31	F	27	MSS
G32	F	30	MSS
G33	F	30	MSS
G34	M	31	MSS
G35	M	28	NA
G36	M	8	MSS
G37	M	3	MSS
G38	M	7	MSS
G39	M	3	MSS
G40	M	19	MSS
G41	M	4	MSI-L
G42	F	15	MSS

**NA**=não amplificou

**Tabela 17-** Status de MSI para os pacientes com meduloblastoma

<b>Paciente Nº</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status MSI</b>
M1	F	35	MSS
M2	M	18	MSS
M3	M	2	MSS
M4	M	11	MSS
M5	F	7	MSS
M6	F	18	MSS
M7	M	2	MSI-L
M8	M	28	MSS
M9	M	19	MSS
M10	F	11	MSS
M11	M	16	MSS
M12	F	10	MSI-L
M13	F	10	MSS

<b>Paciente Nº</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Status MSI</b>
M14	F	2	MSI-L
M15	F	24	MSI-L
M16	M	7	MSS
M17	F	18	MSS
M18	M	26	MSS
M19	M	2	MSS
M20	M	9	MSS
M21	F	23	MSI-L
M22	M	8	MSS
M23	M	8	MSS
M24	M	2	MSS
M25	M	5	MSS
M26	M	5	MSS
M27	F	17	MSS
M28	M	2	MSS
M29	F	4	MSI-L
M30	M	14	MSS
M31	F	27	MSS
M32	F	20	MSS
M33	M	26	MSS
M34	F	9	NA
M35	F	15	MSI-L
M36	M	16	MSI-L
M37	M	28	MSS

**NA**=não amplificou

**Tabela 18-** Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para pacientes com *status* anormal

Pcte	Sexo	Histopatologia	Grau OMS	<i>status</i>	Resultados				
					(intervalo normal dos alelos, por marcador)				
					NR21	BAT26	NR27	BAT25	NR24
				105-107	179-181	86-88	147-149	122-124	
G6	F	Oligodendroglioma Anaplásico	III	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
G8	M	Astrocitoma Pilocítico	I	MSI-L	<b>102-107</b>	181	87	147	124
G10	F	Glioblastoma	IV	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
G21	F	Oligodendroglioma	II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	147	122
G22	M	Oligodendroglioma	II	MSI-L	107	<b>178</b>	88	149	123
G23	M	Oligodendroglioma	II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	123
G41	M	Astrocitoma Pilocítico	I	MSI-L	107	180	87	<b>148-150</b>	123
M7	M	Meduloblastoma	IV	MSI-L	107	<b>177-180</b>	87	<b>146</b>	123
M12	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	<b>165-180</b>	86	147	123
M14	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	105	180	86	<b>144-147</b>	123
M15	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	<b>103-106</b>	180	86	147	122
M21	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	180	87	147	<b>123-132</b>
M29	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	180	<b>84</b>	147	122
M35	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	105	<b>173-179</b>	87	147	123
M36	M	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	180	<b>84-87</b>	148	123

**Pcte**=paciente

## **4.2- Segunda fase - avaliação clínica e genotipagem**

Dos 15 pacientes com instabilidade de microssatélites, apenas seis participaram da segunda etapa, ou seja, compareceram para avaliação clínica e genotipagem dos genes do sistema MMR.

Do grupo dos pacientes com glioma, dois pacientes haviam falecido e um chegou a participar em consulta clínica com médico geneticista, mas os pais não autorizaram a coleta de sangue. A história familiar e o exame clínico desse paciente foram registrados, mas não há dados de genotipagem. Seus dados não serão apresentados aqui, visto não ter sido autorizada sua participação.

Do grupo de pacientes com meduloblastoma, seis pacientes haviam falecido. Uma recusou, inicialmente, ser avaliada, mas com o recém-diagnóstico de câncer de mama em sua mãe, mudou de idéia e buscou atendimento para inclusão no projeto.

Na Tabela 19, encontram-se resumidos os tipos de tumor desses seis pacientes, bem como os resultados da pesquisa de MSI, por marcador. Suas histórias serão descritas em seguida. Um resumo de todos os genótipos encontrados pode ser visto na Tabela 38, após a descrição de todos os casos.

As características dos tumores dos pacientes que não participaram da etapa de avaliação clínica e genotipagem estão reunidas na Tabela 39.

**Tabela 19-** Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para pacientes com *status* anormal e que foram avaliados

Pcte	Histopatologia	Grau OMS	<i>status</i>	Resultados				
				NR21 105-107	BAT26 179-181	NR27 86-88	BAT25 147-149	NR24 122-124
G6	Oligodendroglioma Anaplásico	III	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
G8	Astrocitoma Pilocítico	I	MSI-L	<b>102-107</b>	181	87	147	124
G22	Oligodendroglioma	II	MSI-L	107	<b>178</b>	88	149	123
G23	Oligodendroglioma	II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	123
M12	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	<b>165-180</b>	86	147	123
M36	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	180	<b>84-87</b>	148	123

*Pcte=paciente*

### **Paciente G6**

Sexo feminino, dez anos de idade, avaliada inicialmente por queixa de parestesia em membro inferior direito e dificuldade de deambulação nas nove semanas anteriores ao atendimento. Ao exame clínico de admissão possuía marcha atáxica e estrabismo, referido pela mãe como congênito.

Exames de imagem mostravam lesão expansiva, parcialmente calcificada, medindo 5,1 x 3,6cm, no lobo frontal esquerdo, junto a linha média, com extensão para corpo caloso e compressão do ventrículo lateral esquerdo (Figura 5).

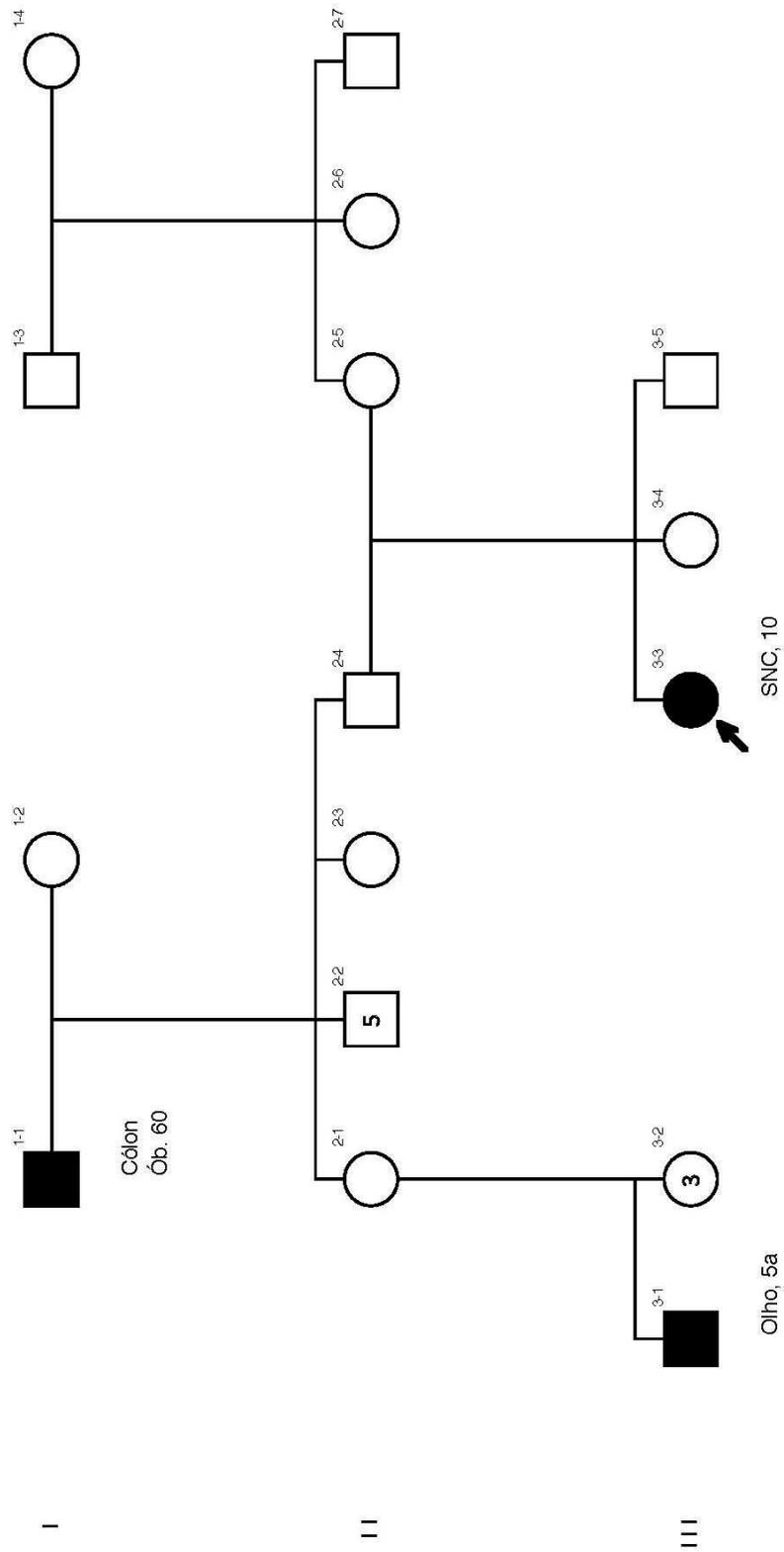
Foi diagnosticada com **oligodendroglioma anaplásico (grau III da OMS)**.

**História Familiar:** ela é a segunda filha de casal não consanguíneo.

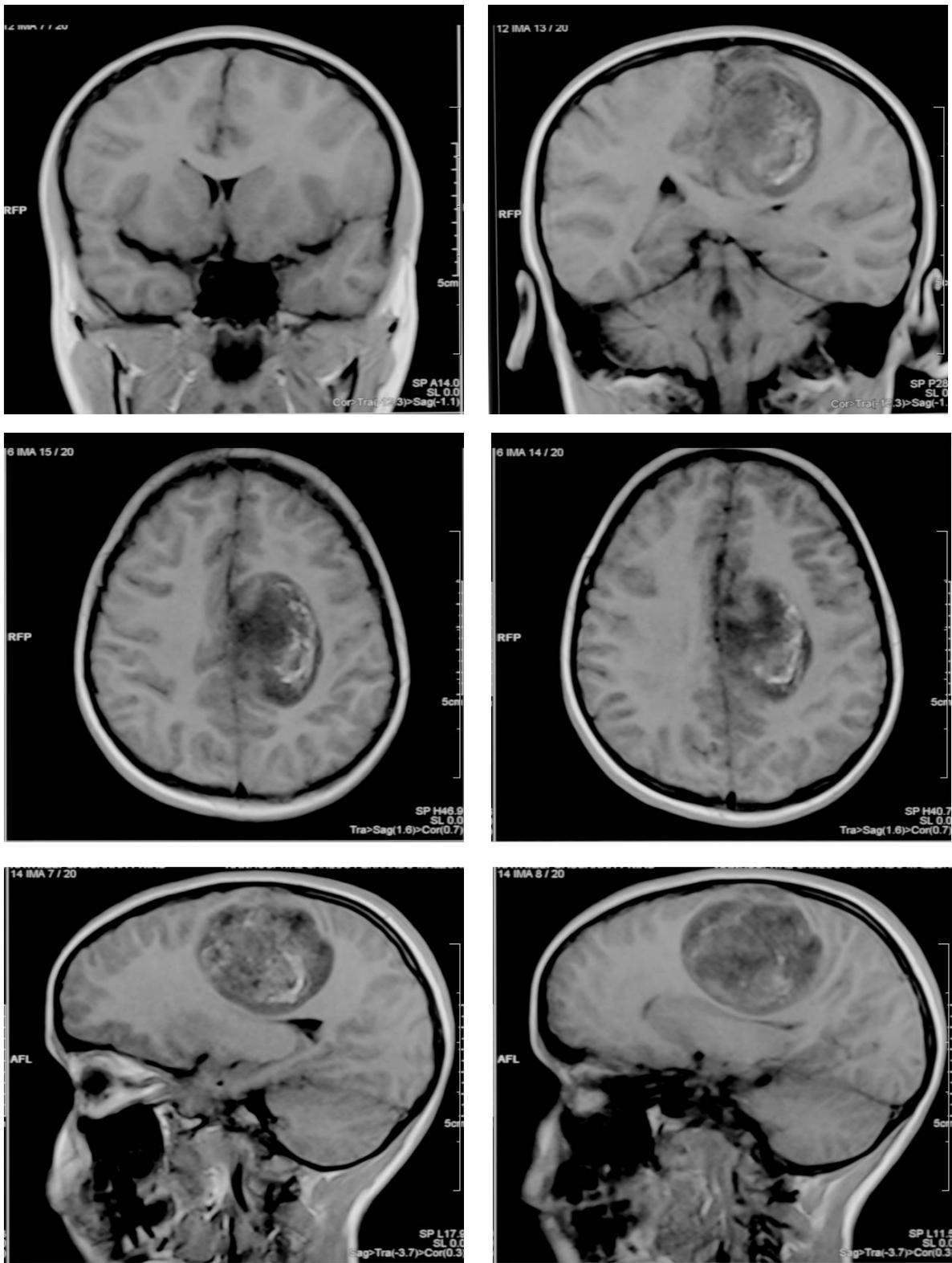
- **Ascendência paterna:** avô faleceu de CCR aos 60 anos de idade. Um primo em primeiro grau teve seu olho enucleado aos cinco anos de idade (atualmente com 22 anos) devido a tumor (retinoblastoma?).
- **Ascendência materna:** não há relatos de câncer, heredopatias ou anomalias congênitas.

O heredograma pode ser visto na Figura 4.

- **Exame Físico:** revelou três grandes manchas café-com-leite >1cm, de coloração clara, no lado esquerdo da face, no pescoço e no abdômen (Figuras 6, 7 e 8). Havia ainda um *nevus spilus* (também denominado *spickled lentiginous nevus* ou *nevus sur nevus*) (Figura 8).



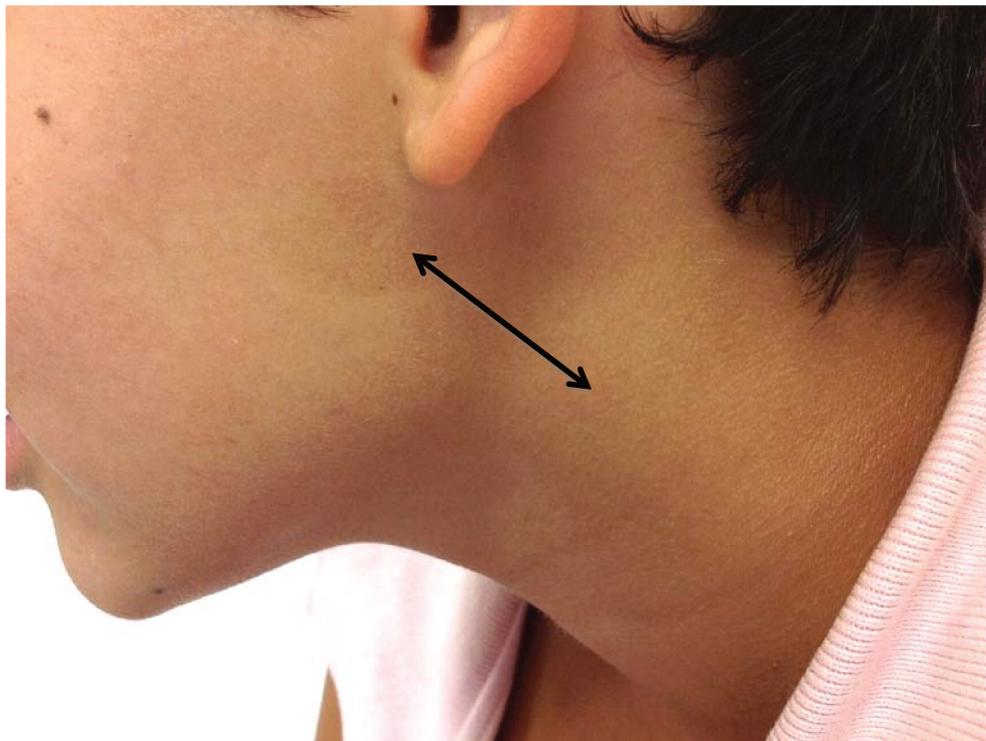
**Figura 4-** Heredograma G6



**Figura 5-** Exames de imagem da paciente G6



**Figura 6-** Mancha café-com-leite - paciente G6



**Figura 7-** Mancha café-com-leite - paciente G6



**Figura 8-** Mancha café-com-leite - paciente G6



**Figura 9-** *Nevus spilus* - paciente G6

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 +; PMS2 +.
- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias. Não pôde ser realizada a pesquisa de rearranjos, uma vez que o DNA disponível esgotou-se nas reações de sequenciamento.

**Tabela 20-** Genótipo do *hMLH1* para a paciente G6

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.655A>G p.Ile219Val	polimorfismo
c.1668-19A>G	polimorfismo
MLPA	NR
<b>NR=não realizado</b>	

**Tabela 21-** Genótipo do *hMSH2* para a paciente G6

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
<i>Wild type</i>	
MLPA	NR
<b>NR=não realizado</b>	

**Tabela 22-** Genótipo do *hMSH6* para a paciente G6

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.276A>G	polimorfismo
c.540T>C	polimorfismo
c.3438+14A>T	polimorfismo
c.3646+35_3646+38delATCT	polimorfismo
c.3246G>T	polimorfismo
MLPA	NR
<b>NR=não realizado</b>	

## **Paciente G8**

Sexo masculino, 11 anos de idade, avaliado inicialmente por queixa de emagrecimento e irritabilidade que evoluíram com diplopia, estrabismo, cefaleia intensa, vômitos e marcha atáxica. Foi submetido a ressecção tumoral na cidade de origem, sendo encaminhado ao hospital para seguimento. Ao exame físico de admissão possuía paralisia do VI e VII par à esquerda, discreta, além de marcha atáxica.

Exames de imagem mostravam lesão cerebelar expansiva, medindo 3,6x3,4cm, predominantemente cística, comprimindo 4º ventrículo e ocasionando hidrocefalia supra-tentorial (Figura 11).

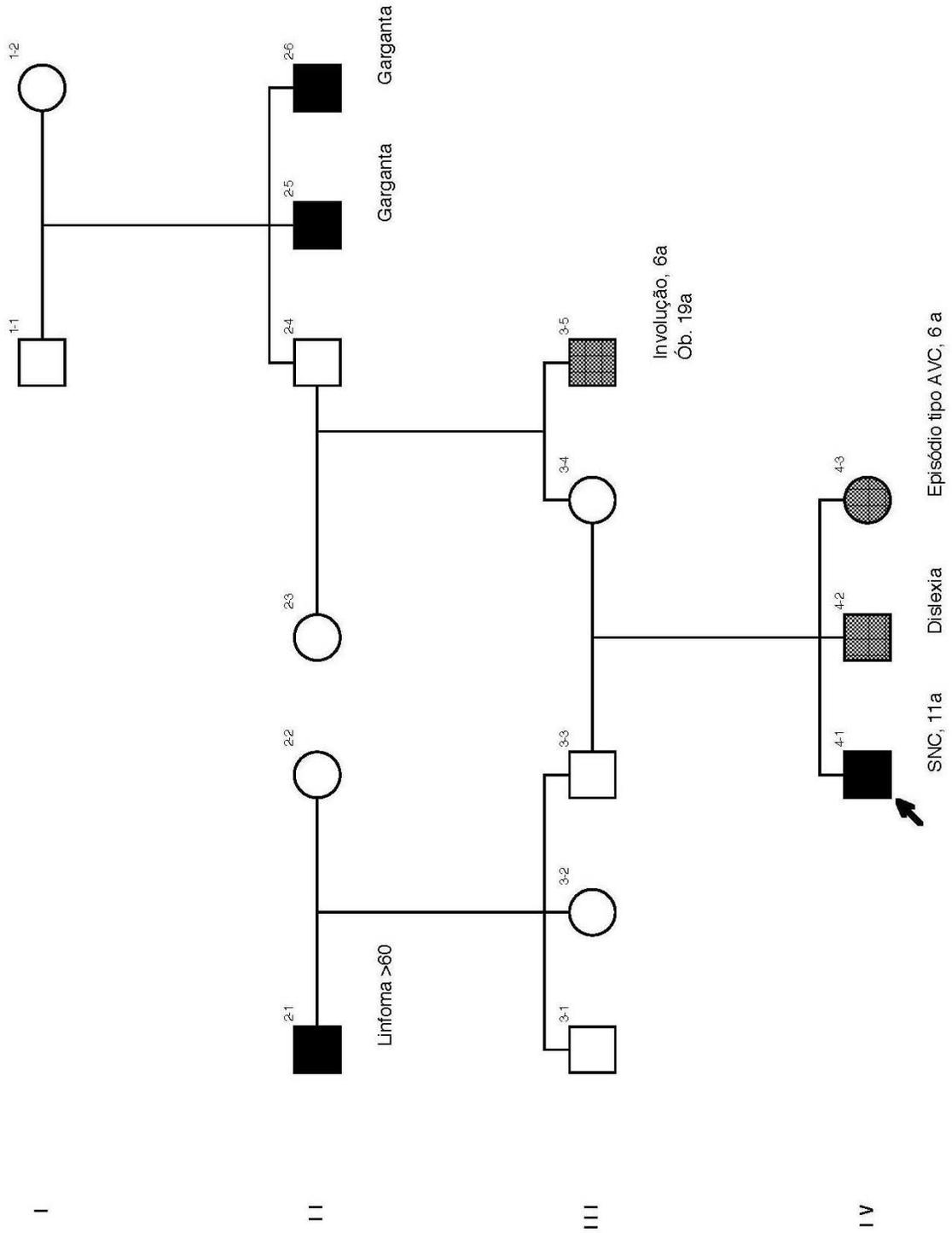
Foi diagnosticado inicialmente com astrocitoma grau II da OMS. No ano seguinte esse diagnóstico foi revisto e reclassificado como **astrocitoma pilocítico grau I da OMS**.

**História Familiar:** ele é o terceiro filho de casal não consanguíneo, em uma prole de três. Chamava atenção a história neurológica na família. Seu irmão mais velho (21 anos) possui diagnóstico de dislexia. Sua irmã “do meio” (17 anos) teve, aos seis anos de idade, uma história de sintomas *stroke-like*, descritos como história de cefaleias, que foram seguidas por início súbito de quadro de hemiparesia esquerda, que se resolveu, quase completamente, após quinze dias (diagnóstico não confirmado). Em sua ascendência materna, um tio faleceu aos 19 anos de idade; tinha história de desenvolvimento normal até os cinco anos, quando é referido um quadro de perda dos marcos de desenvolvimento neuropsicomotor, em ordem aparentemente inversa à de aquisição, sugerindo uma típica involução neurológica.

- **Ascendência paterna:** avô teve linfoma (não especificado, com mais de 60 anos).
- **Ascendência materna:** um irmão e uma irmã de seu avô tiveram câncer de garganta (idades ignoradas).

O heredograma pode ser visto na Figura 10.

- **Exame físico:** efélides faciais, quatro manchas café-com-leite >0,5cm nos braços, uma no abdômen e uma na coxa. Presença de mamilo extra-numerário à direita. Máculas hipopigmentadas, pequenas, arredondadas, no dorso. Alguns nevos pigmentados (Figuras 12 e 13).



**Figura 10-** Heredograma G8

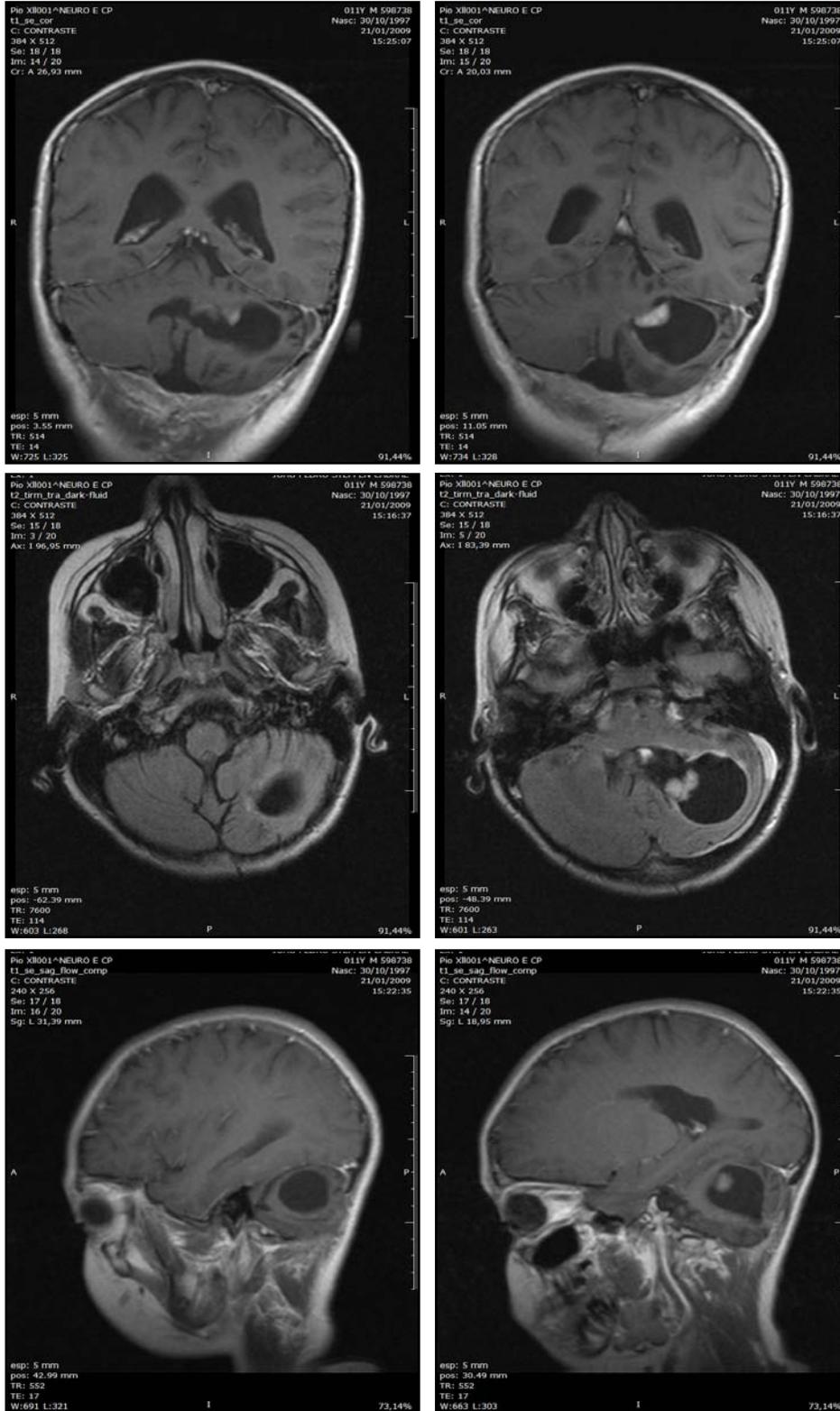
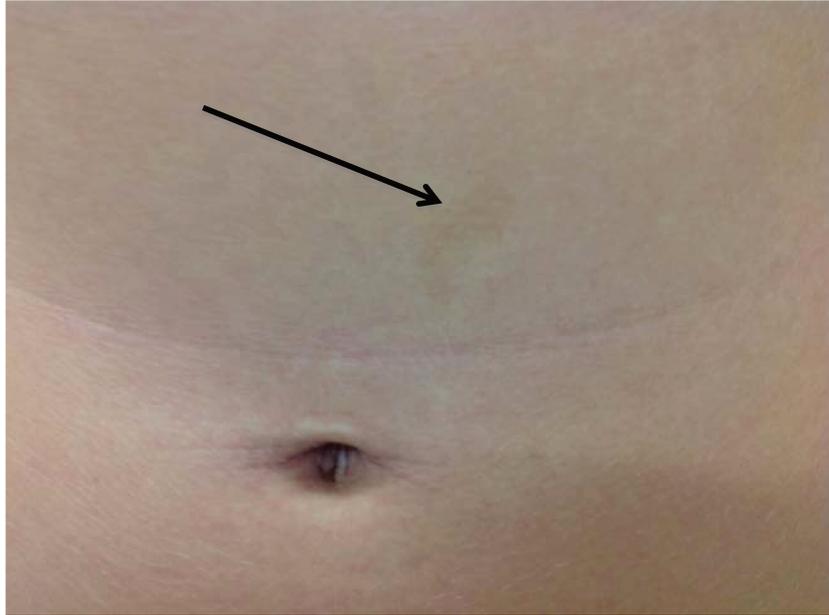


Figura 11- Exames de imagem do paciente G8



**Figura 12-** Lesões de pele - paciente G8



**Figura 13-** Mancha café-com-leite - paciente G8

- **Imunohistoquímica:** não realizada.

- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 23-** Genótipo do *hMLH1* para o paciente G8

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.655A>G p.Ile219Val	polimorfismo
c.1668-19A>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 24-** Genótipo do *hMSH2* para o paciente G8

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 25-** Genótipo do *hMSH6* para o paciente G8

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.3646+35_3646+38delATCT	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

### **Paciente G22**

Sexo masculino, 25 anos de idade, avaliado inicialmente por queixa de crises convulsivas generalizadas de início recente. Em sua investigação foi detectada tumoração cerebral e encaminhado para tratamento. Exame clínico de admissão inespecífico.

Exames de imagem mostravam massa acentuada na região frontal direita medindo 7,0x6,0cm, com efeito de massa desviando a linha média, comprimindo o ventrículo lateral (Figura 15).

Foi diagnosticado **oligodendrogloma grau II da OMS**.

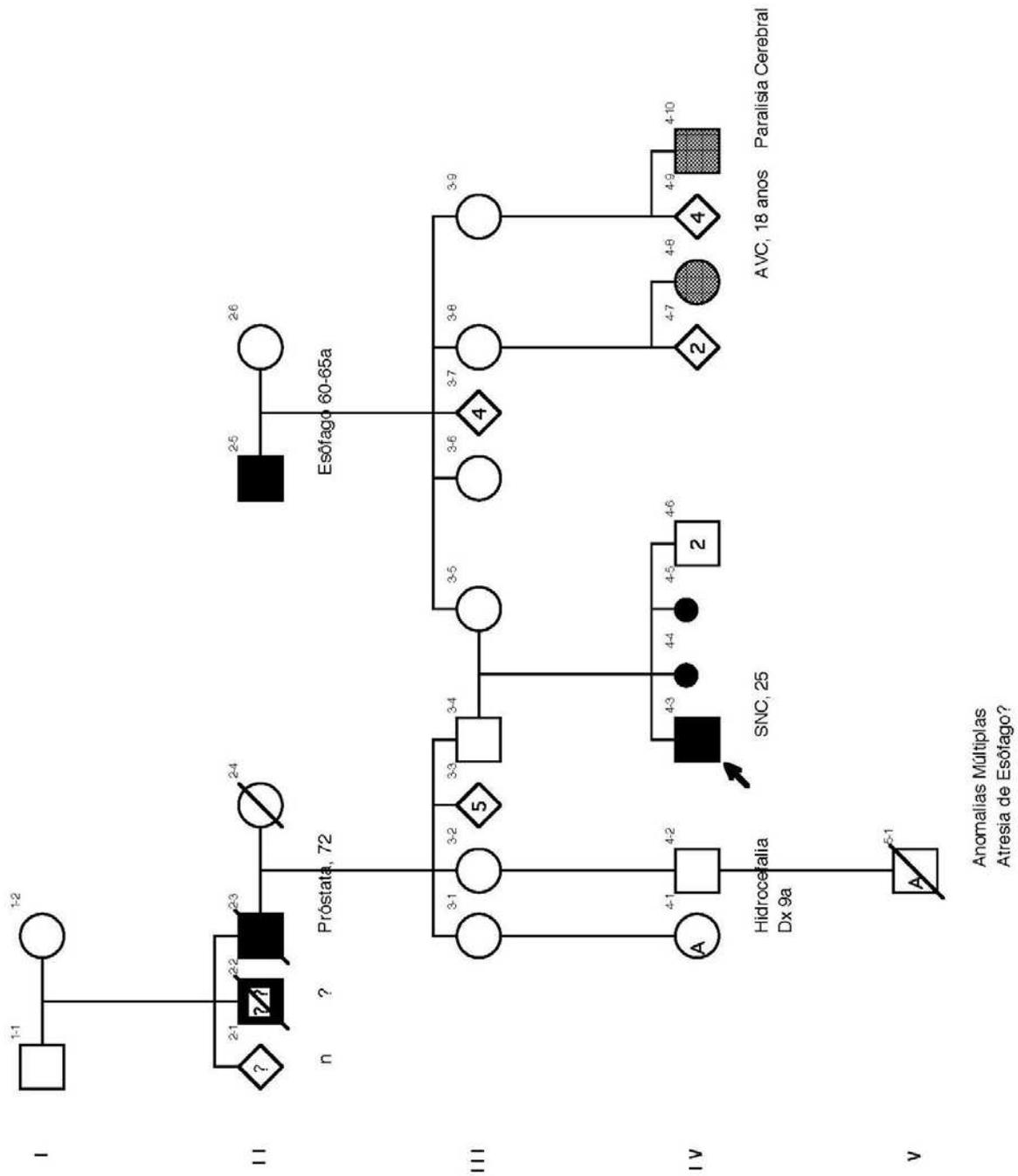
Em seus antecedentes pessoais, relata que durante a infância tinha manchas escuras nas palmas das mãos que desapareceram durante a adolescência.

**História Familiar:** primeiro filho de casal não consanguíneo. Sua mãe teve dois abortamentos espontâneos de primeiro trimestre.

- **Ascendência paterna:** avô teve câncer de próstata aos 72 anos. Um primo em 1º grau teve hidrocefalia diagnosticada aos cinco anos (atualmente com 30). Um primo em segundo grau faleceu, na infância, por anomalias congênicas múltiplas (atresia de esôfago?), sem confirmação do diagnóstico.
- **Ascendência materna:** avô faleceu de câncer de esôfago aos 65 anos. Uma prima em 1º grau tem história de acidente vascular encefálico aos 18 anos de idade.

O heredograma pode ser visto na Figura 14.

- **Exame físico:** sem particularidades. Sem sinais dismórficos ou alterações tegumentares significativas. Não há sinais de hamartomatose ou síndrome de Peutz-Jeghers.



**Figura 14-** Heredograma G22

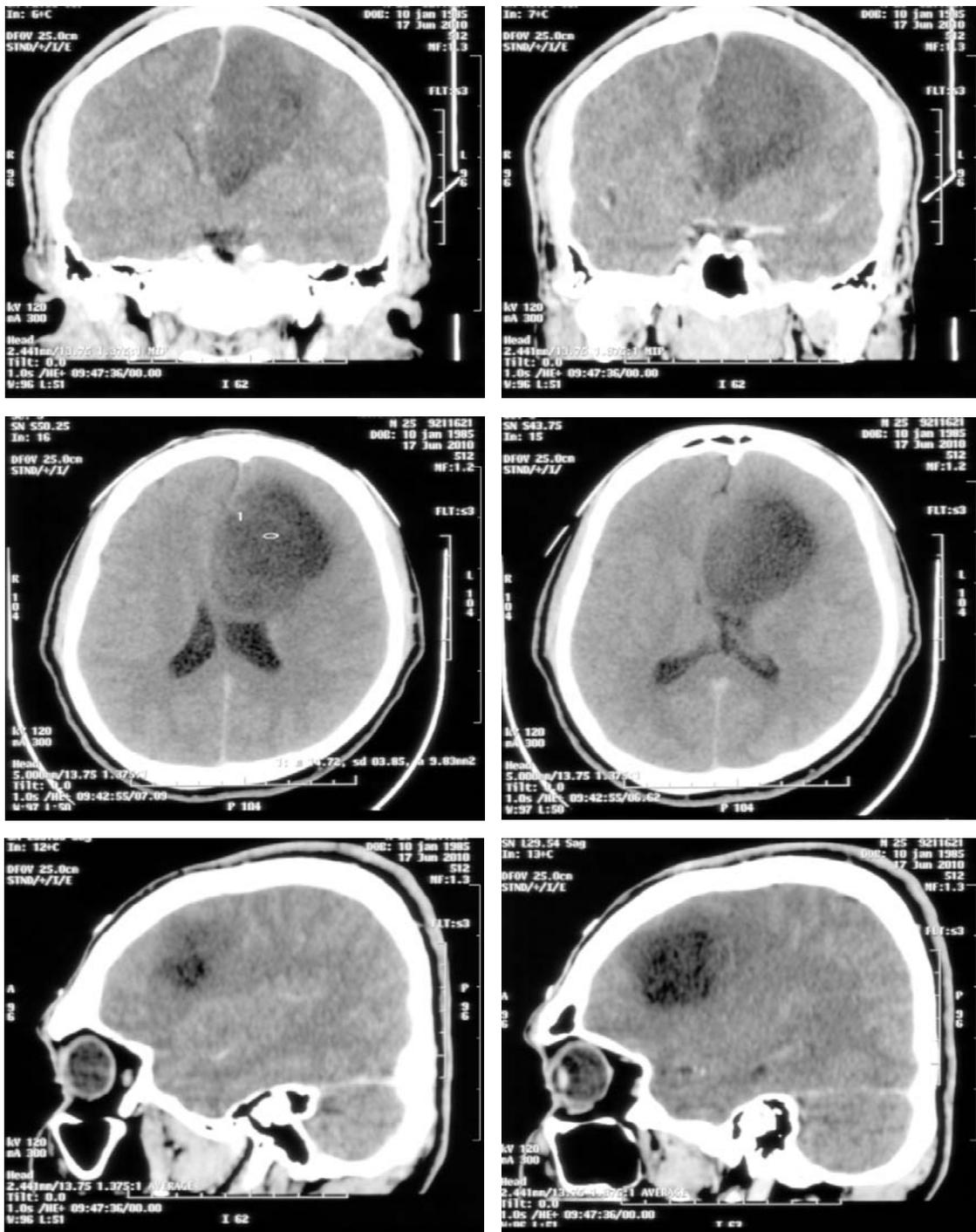


Figura 15- Exames de imagem do paciente G22

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 +; PMS2 +.

- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 26-** Genótipo do *hMLH1* para o paciente G22

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.1668-19A>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 27-** Genótipo do *hMSH2* para o paciente G22

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 28-** Genótipo do *hMSH6* para o paciente G22

<b>Variante encontrada</b>	<b>Classificação</b>
c.3646+35_3646+38delATCT	polimorfismo
c.3438+14A>T	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

### **Paciente G23**

Sexo masculino, 27 anos de idade, avaliado inicialmente por queixa de crises convulsivas generalizadas de início recente. Em sua investigação foi detectada tumoração cerebral e encaminhado para tratamento. Exame clínico de admissão inespecífico.

Exames de imagem mostravam lesão expansiva acometendo lobo temporal e ínsula à esquerda, medindo 7,6x5,5cm, com efeito de massa, comprimindo o ventrículo lateral esquerdo e desviando levemente a linha média para a direita (Figura 17).

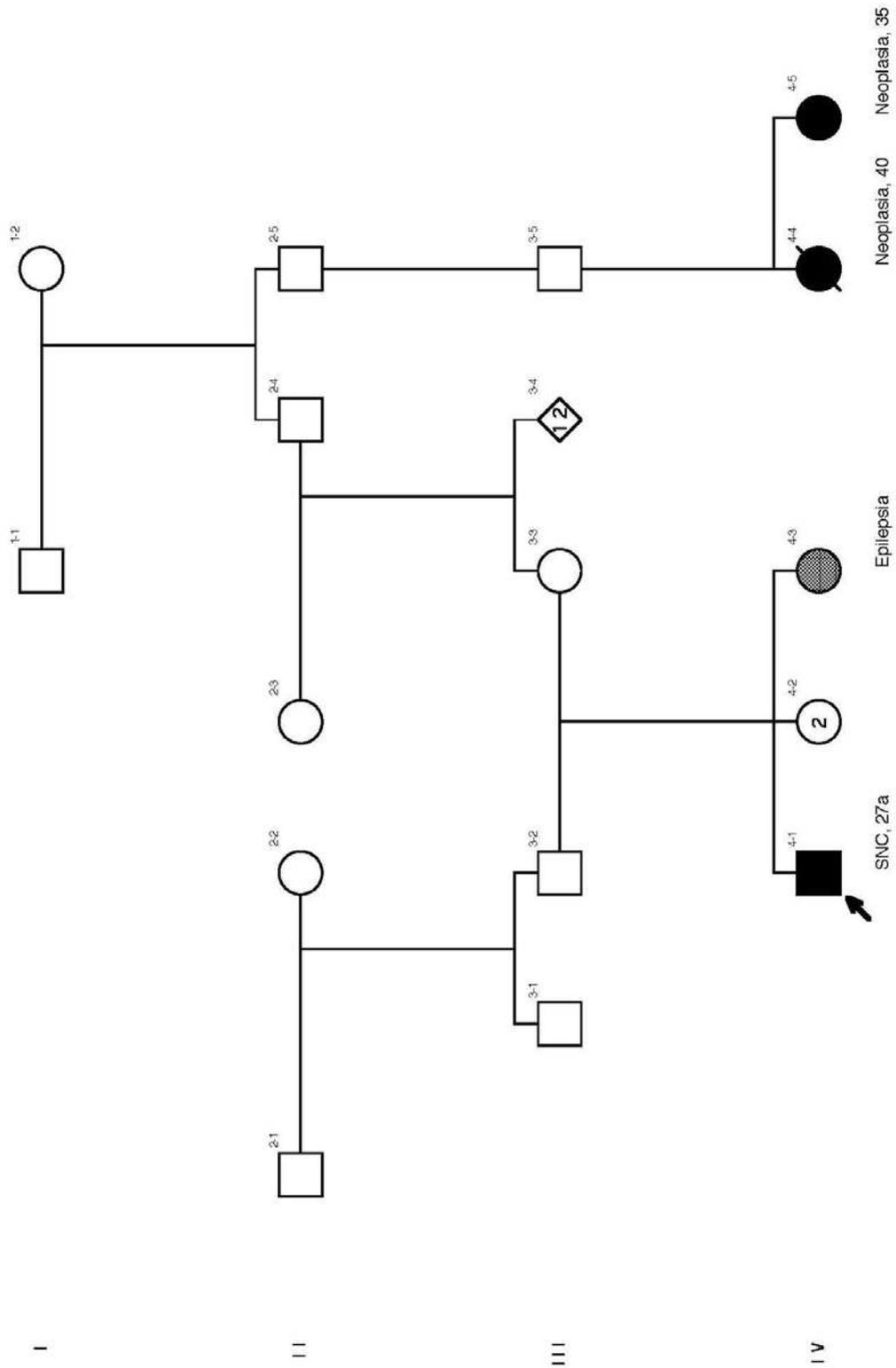
Foi diagnosticado **oligodendroglioma anaplásico grau III da OMS**.

**História Familiar:** ele é o segundo filho de casal não consanguíneo, em uma irmandade de cinco. Referiu que sua irmã mais nova tem crises convulsivas de difícil controle que tiveram início aos 12 anos de idade (atualmente com 18 anos).

- **Ascendência materna-** duas primas em 3º grau tiveram câncer aos 35 e 40 anos, não sabe especificar os sítios.
- **Ascendência paterna-** não há história relevante.

O heredograma pode ser visto na Figura 16.

- **Exame físico:** sem particularidades. Sem sinais dismórficos ou alterações tegumentares significativas.



**Figura 16-** Heredograma G23

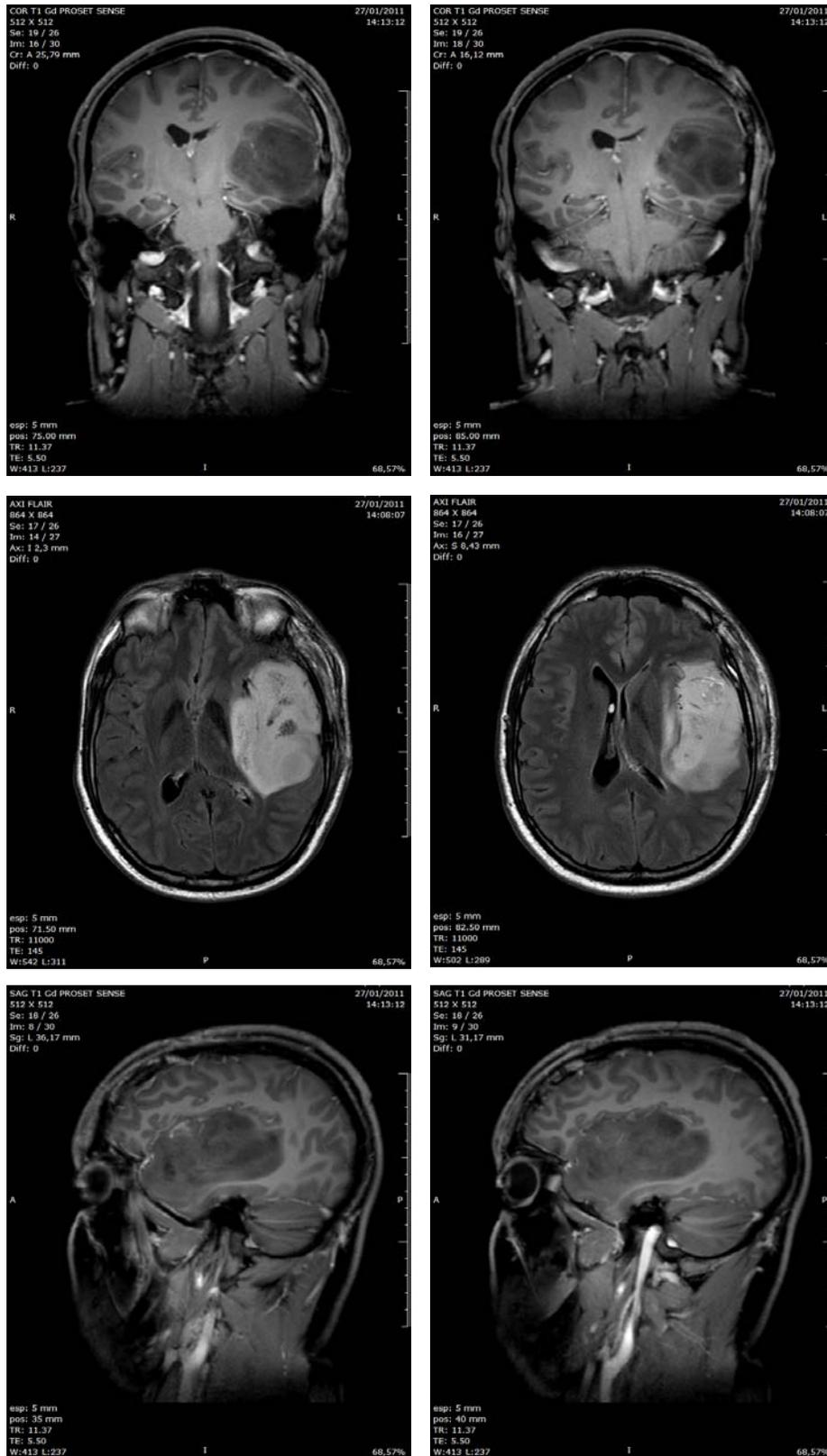


Figura 17- Exames de imagem do paciente G23

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 +; PMS2 +.

- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 29-** Genótipo do *hMLH1* para o paciente G23

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.655A>G p.Ile219Val	polimorfismo
c.1668-19A>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 30-** Genótipo do *hMSH2* para o paciente G23

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 31-** Genótipo do *hMSH6* para o paciente G23

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.3646+35_3646+38delATCT	polimorfismo
c.3246G>T	polimorfismo
c.3802-40C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

## **Paciente M12**

Sexo feminino, dez anos de idade, avaliada inicialmente por queixa de cefaleia parieto-occipital e nugal, com dois meses de evolução, além de diplopia e desequilíbrio. Em sua investigação foi detectada tumoração em fossa posterior e encaminhada para tratamento. Exame clínico de admissão inespecífico.

Exames de imagem mostravam lesão expansiva em topografia de 4º ventrículo medindo 4,0x3,5x4,0cm (exames de imagem de admissão não disponíveis).

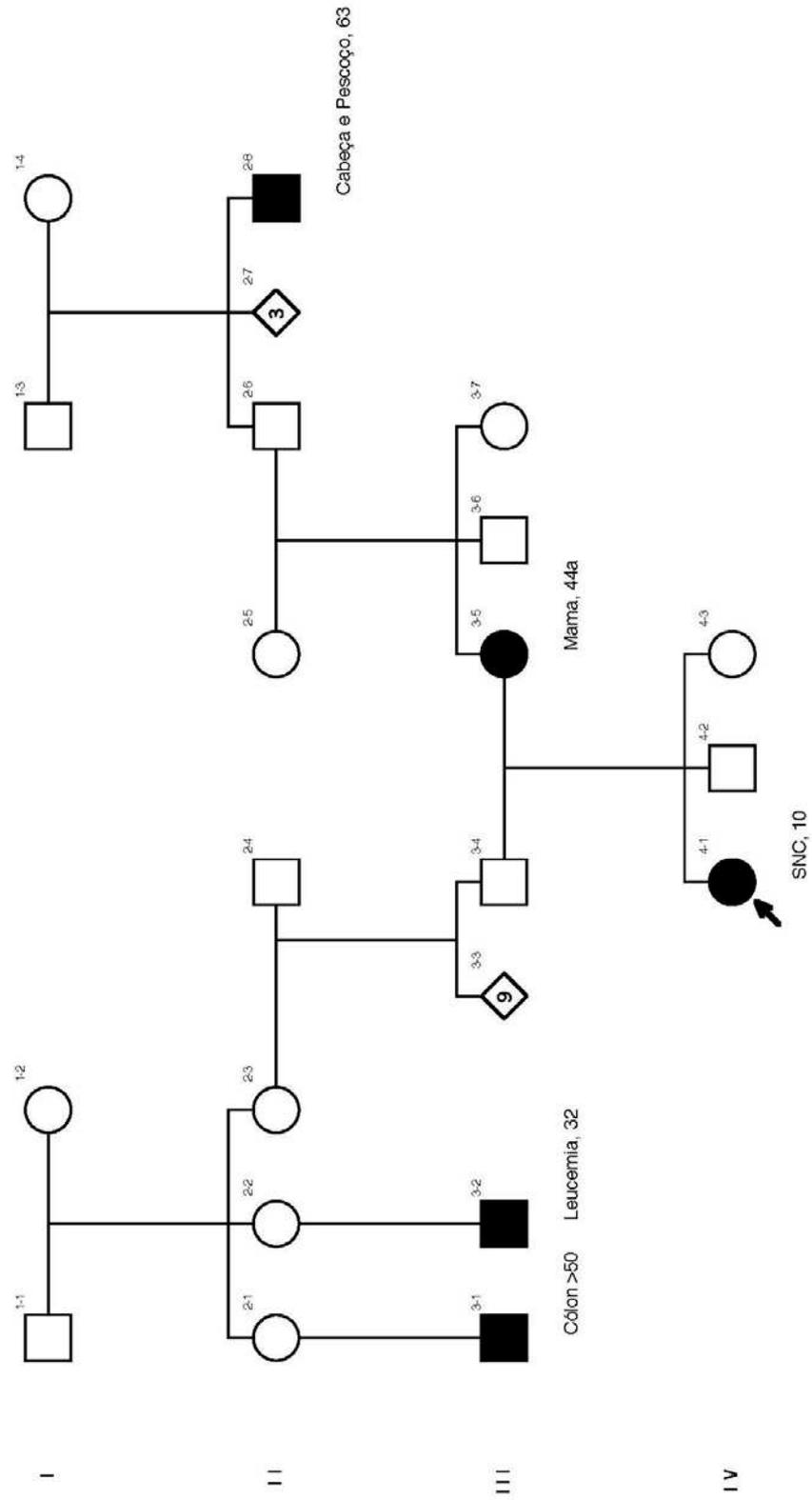
Foi diagnosticado **meduloblastoma grau IV da OMS.**

**História Familiar:** ela é a segunda filha de casal não consanguíneo. Sua mãe foi recém-diagnosticada com câncer de mama aos 44 anos de idade.

- **Ascendência materna-** irmão de seu avô teve câncer de cabeça e pescoço aos 63 anos (tabagista).
- **Ascendência paterna-** primo em 2º grau faleceu de leucemia aos 32 anos de idade. Primo em 2º grau teve câncer de cólon (com mais de 50 anos).

O heredograma pode ser visto na Figura 18.

- **Exame físico:** sem particularidades. Sem sinais dismórficos ou alterações tegumentares significativas.



**Figura 18-** Heredograma M12

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 +; PMS2 +.

- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 32-** Genótipo do *hMLH1* para o paciente M12

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
<i>Wild type</i>	
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 33-** Genótipo do *hMSH2* para o paciente M12

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 34-** Genótipo do *hMSH6* para o paciente M12

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.276A>G	polimorfismo
c.540T>C	polimorfismo
c.3646+35_3646+38delATCT	polimorfismo
c.3438+14A>T	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

### **Paciente M36**

Sexo masculino, 16 anos de idade, avaliado inicialmente por queixa de cefaleia de três meses de evolução, associada a vômitos, e que não melhorava com uso de analgésicos. Foi detectada tumoração em fossa posterior e encaminhado para tratamento. Exame clínico de admissão inespecífico.

Exames de imagem mostravam lesão expansiva em contato com o 4º ventrículo, medindo 3,6cm, ocasionando hidrocefalia (Figura 20).

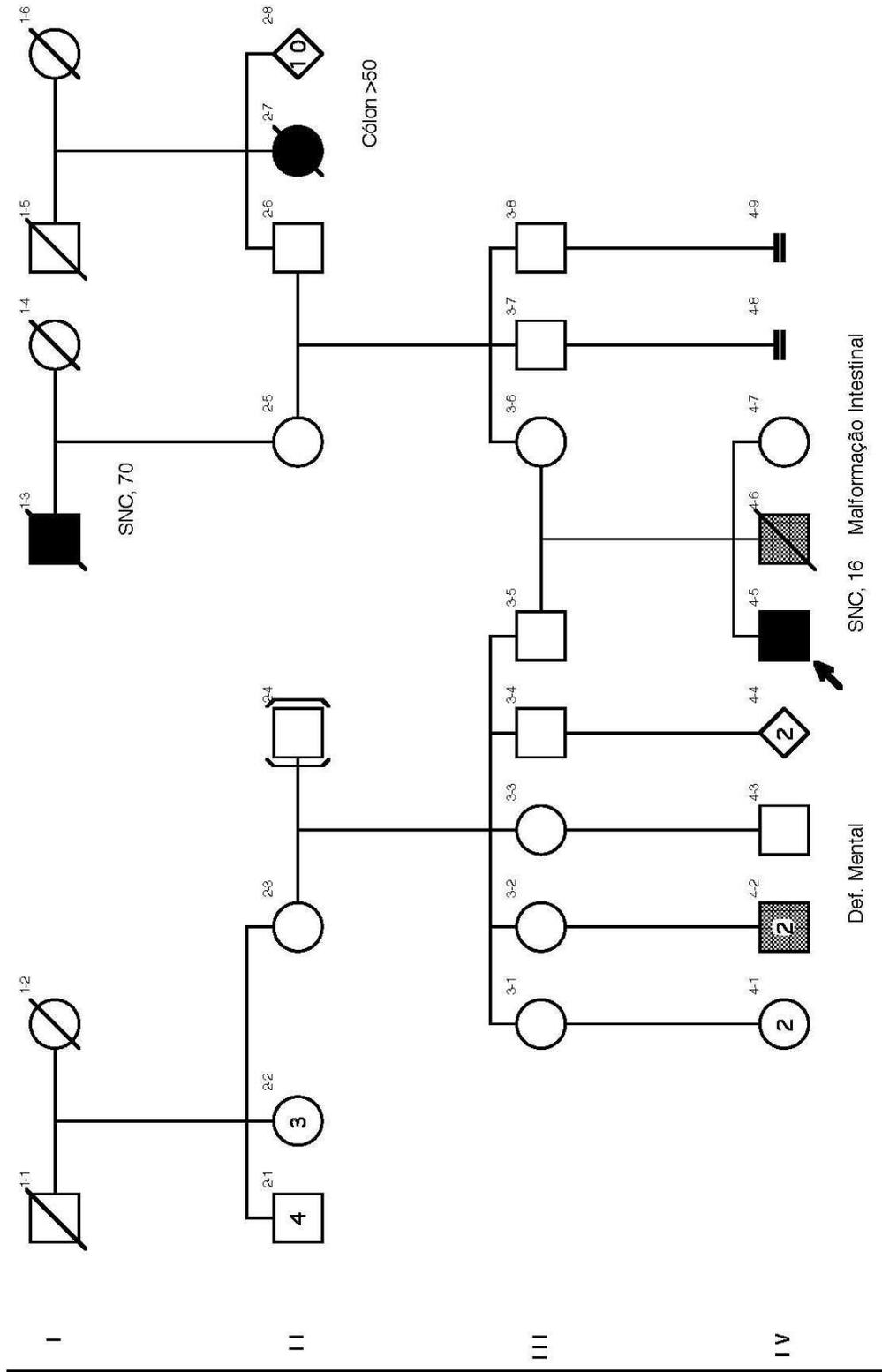
Foi diagnosticado **meduloblastoma grau IV da OMS**.

**História Familiar:** ele é o primeiro filho de casal não consanguíneo. Seus pais perderam o primeiro filho com alguns dias de vida devido a “malformação intestinal” (*sic*) (sem diagnóstico).

- **Ascendência materna-** irmã de seu avô teve câncer de cólon com mais de 50 anos.
- **Ascendência paterna-** dois primos em 1º grau (irmãos entre si) e filhos de uma irmã de seu pai têm deficiência mental.

O heredograma pode ser visto na Figura 19.

- **Exame físico:** sem particularidades. Sem sinais dismórficos ou alterações tegumentares significativas.



**Figura 19- Heredograma M36**

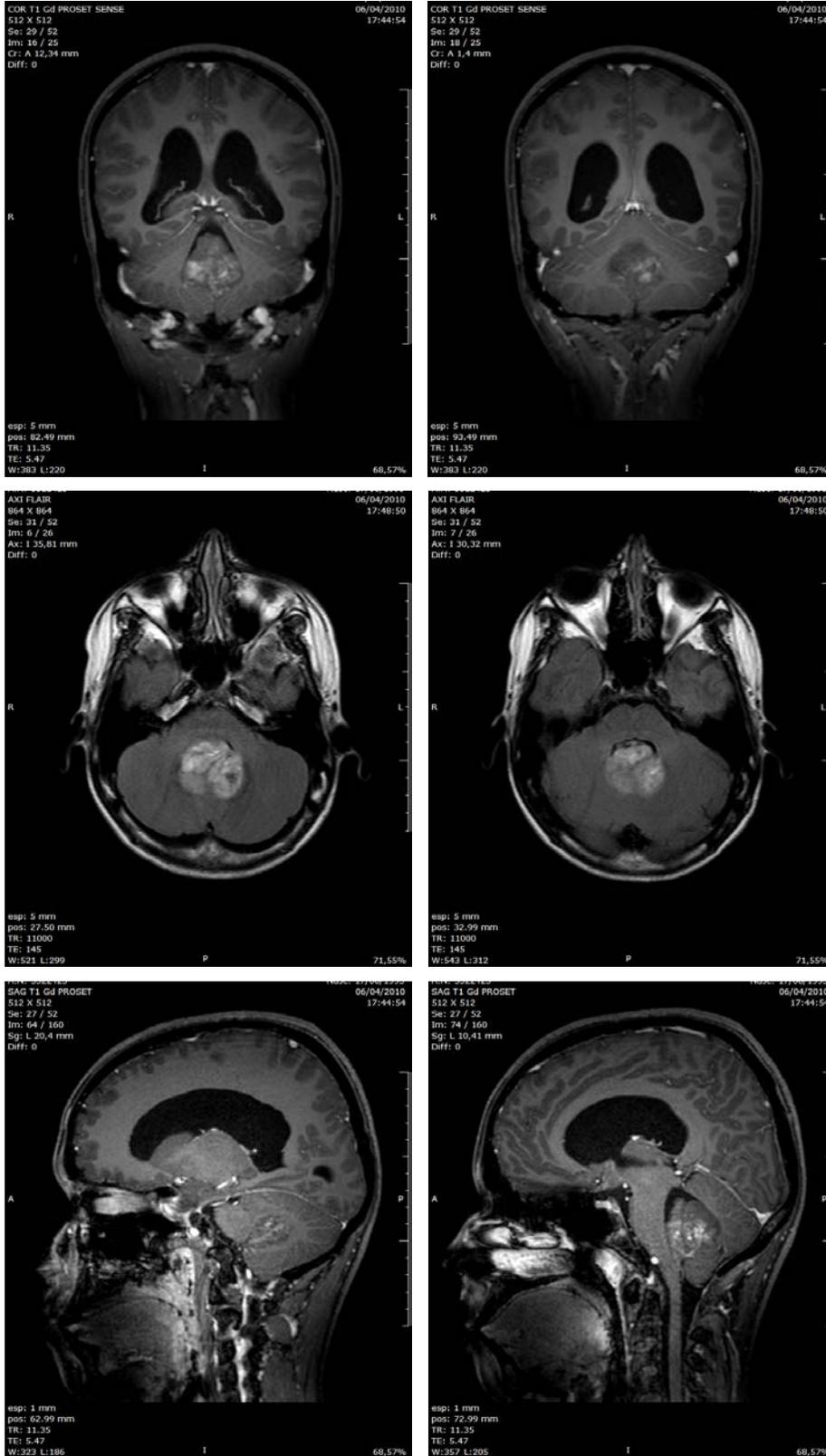


Figura 20- Exames de imagem do paciente M36

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 +; PMS2 +.

- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 35-** Genótipo do *hMLH1* para o paciente M36

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
<i>Wild type</i>	
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 36-** Genótipo do *hMSH2* para o paciente M36

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 37-** Genótipo do *hMSH6* para o paciente M36

<b>Variantes encontradas</b>	<b>Classificação</b>
c.276A>G	polimorfismo
c.540T>C	polimorfismo
c.3438+14A>T	polimorfismo
c.3802-40C>G	polimorfismo
c.1730G>A p.Arg577His	VUS
MLPA	<i>Wild type</i>

**VUS**=variant of unknown significance

**Tabela 38- Resumo das variantes encontradas**

Variante	Pacientes					
	G6	G8	G22	G23	M12	M36
<b>MLH1</b>						
c.655A>G p.Ile219Val	SIM	SIM	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
c.1668-19A>G	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO	NÃO
MLPA MLH1	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
<b>MSH2</b>						
c.211+9C>G	NÃO	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM
MLPA MSH2	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
<b>MSH6</b>						
c.276A>G	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM
c.540T>C	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	SIM
c.3438+14A>T	SIM	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO
c.3646+35_3646+38delATCT	SIM	SIM	SIM	SIM	SIM	NÃO
c.3246G>T	SIM	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	NÃO
c.3438+14A>T	SIM	NÃO	SIM	NÃO	SIM	SIM
c.3802-40C>G	NÃO	NÃO	NÃO	SIM	NÃO	SIM
c.1730G>A p.Arg577His	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	SIM
MLPA MSH6	NR	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO	NÃO

**NR**=Não realizado

**Tabela 39-** Resumo das características dos pacientes que não participaram da avaliação clínica

<b>Paciente</b>	<b>Sexo</b>	<b>Histopatologia</b>	<b>Grau OMS</b>	<b>Idade</b>	<b>Status</b>
G10	F	Glioblastoma	IV	32	falecido
G21	F	Oligodendroglioma	II	26	falecido
G41	M	Astrocitoma Pilocítico	I	4	vivo
M7	M	Meduloblastoma	IV	2	falecido
M14	F	Meduloblastoma	IV	2	falecido
M15	F	Meduloblastoma	IV	24	falecido
M21	F	Meduloblastoma	IV	23	falecido
M29	F	Meduloblastoma	IV	4	falecido
M35	F	Meduloblastoma	IV	15	falecido

### **Determinação do intervalo de variação *Quasi*-monomórfica**

A ausência de mutações deletérias nos genes *hMLH1*, *hMSH2* e *hMSH6*, ainda que não tenha sido realizado o sequenciamento do gene *hPMS2*, levantou a questão se não poderia haver uma diferença de padrão nos alelos quase monomórficos, uma vez que padrões de referência presentes nos dados de literatura se baseiam sobretudo na população caucasiana e talvez pudesse haver diferenças em uma população miscigenada, como a brasileira. Reforçava essa hipótese o fato de que o próprio grupo que introduziu o atual painel de marcadores já referira que na população africana subsaariana há 10% de variação nos alelos para os marcadores NR27, BAT25 e BAT26, variação não encontrada na população europeia, asiática e ameríndia. Na população europeia, 95% das pessoas não têm variação em nenhum dos marcadores, enquanto 5% possuem variação em apenas um deles<sup>(178,185)</sup>.

Reanalizando a tabela de MSI (Tabela 18), alguns pacientes apresentavam pequena variação em seus alelos, de apenas um par de base, o que os classificava como MSI-L. Essa pequena variação poderia ser normal (polimórfica), refletindo uma característica populacional, visto não haver estudos que tenham determinado o intervalo de variação *quasi*-monomórfica (*quasimonomorphic variation range* - QMVR) na população brasileira.

Um novo objetivo foi estabelecido e amostras de DNA constitutivo de 214 pessoas saudáveis, doadores de sangue e derivados no HCB, que tinham material armazenado no banco de material biológico da instituição, foram utilizadas com a finalidade de estabelecer o QMVR de uma população brasileira. Essa nova proposta teve aprovação do CEP do HCB. A idade média dos doadores era de 33 anos, 52,3% eram do sexo masculino. Foi utilizada a mesma técnica de pesquisa de instabilidade de microssatélites. Adicionalmente, foram utilizadas linhagens celulares de CCR com MSI (Co115, DLD1 e LoVo), como controle positivo, e linhagens MSS (CaCo2, DIFI, HT29, SW480 e SW620), como controle MSS.

O QMVR para cada marcador foi estabelecido a partir da média do tamanho dos alelos, mais ou menos três nucleotídeos, conforme dados da literatura<sup>(77,186)</sup>. O *software* SPSS v19 (IBM, EUA) foi usado para análise estatística. O nível de significância estabelecido foi  $p < 0,05$ .

As 214 amostras foram amplificadas, conforme já descrito, gerando 428 alelos para cada marcador. Os tamanhos dos alelos e as frequências absoluta e relativa são mostrados na Tabela 40.

**Tabela 40-** Tamanho dos alelos e QMVR para cada marcador

NR-27			NR-21			NR-24			BAT-25			BAT-26		
pb	n	%	pb	n	%	pb	n	%	pb	n	%	pb	n	%
80			99			118			133			163		
81	1	0,23	100	4	0,93	119			134	1	0,23	164	1	0,23
82	2	0,46	101	2	0,46	120	11	2,57	135			165	13	3
83	7	1,63	102	3	0,7	121	65	15,18	139	3	0,69	174		
84	119	27,8	103	26	6,07	122	263	61,4	140	2	0,46	175	11	2,57
85	265	61,9	104	195	45,56	123	89	20,79	142	1	0,23	176	45	10,51
86	32	7,48	105	182	42,52	124			143	9	2,1	177	212	49,53
87	2	0,46	106	16	3,73	125			144	55	12,85	178	142	33,17
88			107			126			145	185	43,22	179	3	0,7
89			108						146	140	32,7	180	1	0,23
									147	24	5,6	181		
									148	8	1,87	182		
									149					
									150					

O cinza mais escuro representa a moda, o cinza mais claro mostra a QMVR para cada marcador.

**n**=número de alelos, **pb**=tamanho em pares de base

Dos marcadores, o NR-27 teve um perfil estável, com QMVR de 82-88pb, com apenas um alelo (de 81pb) fora do QMVR. O NR-21 teve alelos quase monomórficos variando de 101 a 107pb e quatro alelos de 100pb estão fora do intervalo. Para o NR-24, o QMVR ficou entre 119-125, e não foram encontrados alelos fora dessa variação. O BAT-25 variou de 142-148, tendo seis alelos fora do intervalo (1,38%), enquanto BAT-26 variou de 174-180, com 14 alelos fora do QMVR (3,25%). No total 23 pessoas (10,7%) tinham alelos fora do QMVR, contudo, nenhuma delas possuía mais de um marcador fora do intervalo.

Se fosse reescrita a tabela inicial de resultados de pesquisa de instabilidade de microssatélites nos pacientes, utilizando como padrão o novo valor específico para a população atendida, ela mudaria, como ilustrado na Tabela 41.

**Tabela 41-** Resultados da pesquisa de MSI, após QMVR

Pcte	Sexo	Histopatologia	Grau OMS	<i>status</i>	Resultados				
					(intervalo normal dos alelos, por marcador)				
					NR21	BAT26	NR27	BAT25	NR24
				101-107	174-180	82-88	142-148	119-125	
G6	F	Oligodendroglioma Anaplásico	III	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
G8	M	Astrocitoma Pilocítico	I	MSI-L	102-107	<b>181</b>	87	147	124
G10	F	Glioblastoma	IV	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
G21	F	Oligodendroglioma	II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	147	122
G22	M	Oligodendroglioma	II	MSI-L	107	178	88	<b>149</b>	123
G23	M	Oligodendroglioma	II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	123
G41	M	Astrocitoma Pilocítico	I	MSI-L	107	180	87	<b>148-150</b>	123
M7	M	Meduloblastoma	IV	MSS	107	177-180	87	146	123
M12	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	<b>165-180</b>	86	147	123
M14	F	Meduloblastoma	IV	MSS	105	180	86	144-147	123
M15	F	Meduloblastoma	IV	MSS	103-106	180	86	147	122
M21	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	106	180	87	147	<b>123-132</b>
M29	F	Meduloblastoma	IV	MSS	106	180	84	147	122
M35	F	Meduloblastoma	IV	MSI-L	105	<b>173-179</b>	87	147	123
M36	M	Meduloblastoma	IV	MSS	106	180	84-87	148	123

O cinza mais escuro representa os que mudaram de *status*, o cinza mais claro mostra os que tiveram marcadores alterados, mas mantiveram seu *status*.

**Pcte**=paciente

### **Paciente extra-série**

Após o fechamento da série de pacientes (em 2011), em novembro de 2012, foi encaminhada para avaliação na rotina de atendimento clínico uma paciente do sexo feminino com seis anos de idade. Para fins estatísticos, ela não foi incluída nos cálculos do presente trabalho, mas seu caso é aqui descrito. Seus pais consentiram em participar do estudo.

Exames de imagem mostravam duas lesões, uma na fossa posterior, outra frontal, interpretadas como dois tumores primários (Figura 22).

Foi diagnosticada com **meduloblastoma (grau IV da OMS)**.

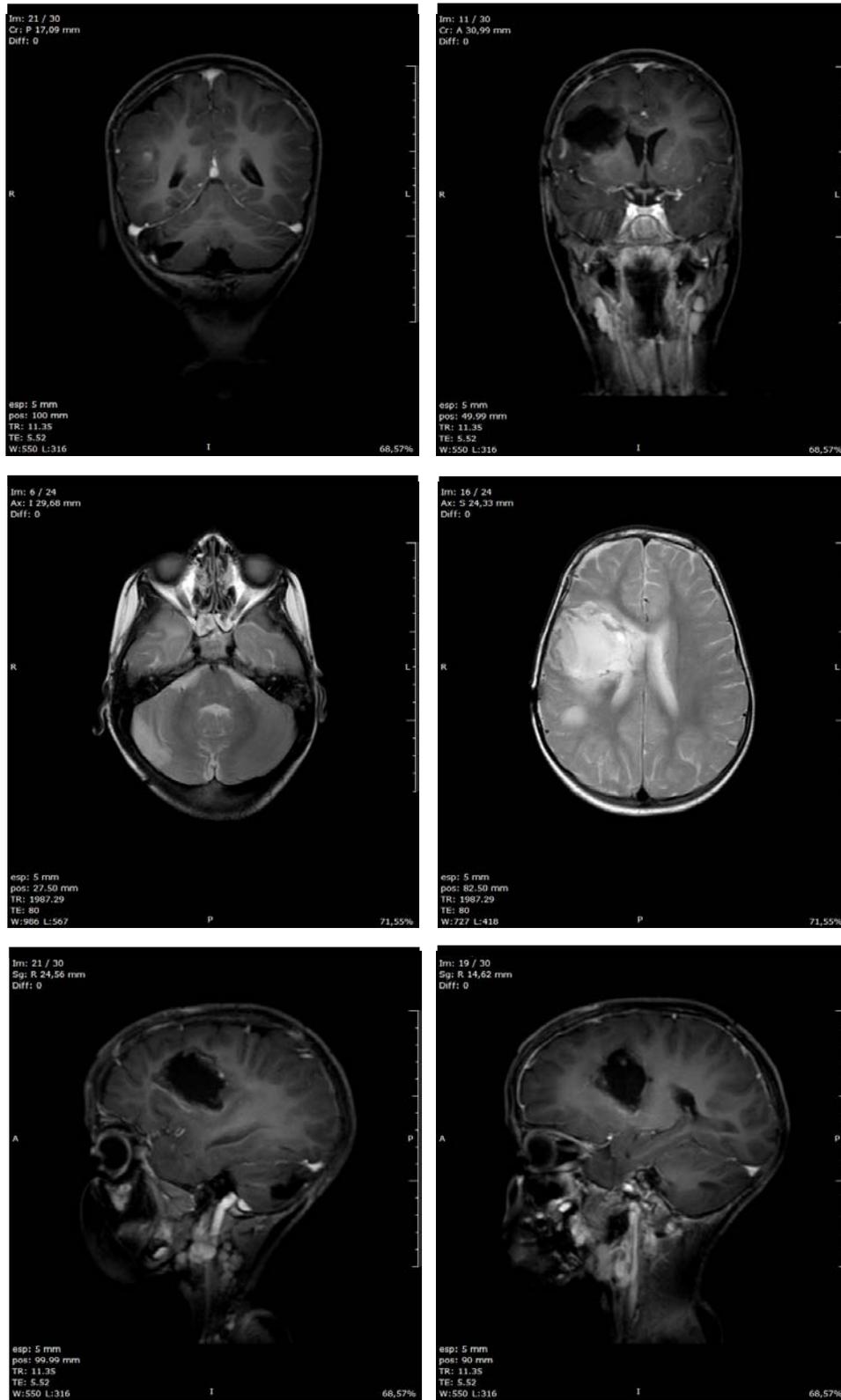
**História Familiar:** ela era a primeira filha de casal consanguíneo (primos em 1º grau).

- **Ascendência comum:** bisavô (pai de sua avó paterna e de seu avô materno) possui manchas café-com-leite e teve câncer de próstata aos 60 anos. Primo duplo em primeiro grau tem dificuldade de aprendizagem e de ganho pômdero-estatural.
- **Ascendência paterna:** avô teve câncer de próstata aos 57 anos.
- **Ascendência materna:** bisavó (mãe de sua avó) teve câncer de pâncreas aos 57 anos.

O heredograma pode ser visto na Figura 21.

- **Exame Físico:** revelou mais de cinco manchas café-com-leite >0,5cm, no tronco e nos membros, de formato e pigmentação irregular; algumas manchas hipocrômicas, de formatos irregulares e bordas imprecisas, além de um *nevus spilus* (*spickled lentiginous nevus* ou *nevus sur nevus*), bem como hérnia umbilical (Figuras 23, 24, 25, 26 e 27).





**Figura 22-** Exames de imagem da paciente ES



**Figura 23-** Lesões de pele - paciente ES



**Figura 24-** Nevo pigmentado - paciente ES



**Figura 25-** *Nevus spilus* - paciente ES



**Figura 26-** Mancha café-com-leite - paciente ES



**Figura 27-** Mancha café-com-leite - paciente ES

- **Imunohistoquímica:** MLH1 +; MSH2 +; MSH6 positivo focal; PMS2 +.
- **Pesquisa de MSI:** MSI-L.
- **Genotipagem:** não foram encontradas mutações deletérias.

**Tabela 42-** Resultados da pesquisa de MSI, por marcador, para a paciente ES

Paciente Nº	Tumor	Resultados					
			NR21	BAT26	NR27	BAT25	NR24
		<i>status</i>	101-107	174-180	82-88	142-148	119-125
Paciente ES	Meduloblastoma OMS grau IV	MSI-L	101-103	<b>172</b>	84	145-146	121

**Tabela 43-** Genótipo do *hMLH1* para a paciente ES

Variantes encontradas	Classificação
<i>Wild type</i>	
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 44-** Genótipo do *hMSH2* para a paciente ES

Variantes encontradas	Classificação
c.211+9C>G	polimorfismo
MLPA	<i>Wild type</i>

**Tabela 45-** Genótipo do *hMSH6* para a paciente ES

Variantes encontradas	Classificação
<i>Wild type</i>	
MLPA	<i>Wild type</i>





## **5- DISCUSSÃO**



O trabalho aqui apresentado buscou identificar casos do fenótipo de SL com mutações bialélicas, utilizando a pesquisa de instabilidade microssatélites para rastrear uma amostra de pacientes de zero a 35 anos com tumores de SNC. O fato de ser uma faixa etária mista de infantil e adulto jovem dificulta comparações, mas se procurará pontuar as comparações baseando-se sobretudo na faixa etária infantil.

Meduloblastomas e gliomas possuem origens distintas, por isso a necessidade de separá-los. Os meduloblastomas são altamente malignos e agressivos, sendo classificados pela OMS como grau IV, e do ponto de vista patológico como tumores embrionários do cerebelo, com diferenciação predominantemente neuronal, localização na linha média, no vérmix cerebelar ou no 4º ventrículo, e metastatização via líquido céfalo-raquidiano precoce, de forma que, ao diagnóstico, 14-43% dos pacientes já possuem disseminação da doença<sup>(174)</sup>. Sendo tumores embrionários, a correlação com hereditariedade é antiga, e desde a década de 1960 já se reconhece sua relação com algumas condições hereditárias, como as síndromes de Gorlin, “*Turcot*”, Li-Fraumeni, Coffin-Siris e ataxia-telangiectasia<sup>(173)</sup>. Os meduloblastomas representam 20% dos casos de tumor de SNC na infância, com pico de incidência ao redor de quatro anos de idade, sendo que 30% ou mais ocorrem após os 15 anos<sup>(173)</sup>. No presente estudo, dos 37 casos de meduloblastoma estudados, 15 (40,5%) possuíam mais de 15 anos de idade, mas esse número inclui dez (27% do total) que possuíam mais de 18 anos. A inclusão dos adultos jovens desloca a idade média da amostra para 13 anos, com mediana de 11. Mesmo excluindo os casos após 18 anos, a idade média e mediana ficam em nove anos, mostrando que os casos da população estudada tem idade superior à esperada ( $p < 0,05$ ), talvez refletindo um viés de seleção de pacientes; possivelmente somente chegariam a um hospital especializado os pacientes “sobreviventes”, uma vez que a sobrevivência é muito pior em crianças com menos de três anos de idade<sup>(173)</sup>. Outra explicação seria uma seleção que aumentasse na amostra aqueles casos que foram operados na instituição, o que pode ter ocorrido, visto terem sido incluídos apenas aqueles que tinham amostra de tumor armazenada no banco de tumores da instituição e,

portanto, os pacientes incluídos no presente estudo talvez não sejam representativos da totalidade dos pacientes atendidos na instituição.

Em relação aos gliomas, eles correspondem à maioria dos tumores supra-tentoriais na faixa pediátrica e, ao contrário do que ocorre em adultos, apenas 20% deles possuem comportamento maligno<sup>(173)</sup>. Do ponto de vista de sua origem, os gliomas são originários, como o nome sugere, de células da glia, o que leva a uma variedade de diferentes subtipos histológicos, como o astrocitoma, o ganglioglioma, o astroblastoma, o ependimoma, o oligodendroglioma, o glioblastoma, entre outros subtipos, constituindo um grupo heterogêneo de tumores, havendo controvérsias no diagnóstico histopatológico e classificação entre diferentes patologistas que examinem uma mesma lâmina. A classificação da OMS varia conforme o tipo histológico, mas no geral correspondem ao grau I, o astrocitoma pilocítico não infiltrativo, ao grau II, o astrocitoma difuso, ao grau III, o astrocitoma anaplásico e ao grau IV, o glioblastoma multiforme. Tumores de grau I e II são considerados gliomas de baixo grau. Tumores de grau III e IV correspondem aos gliomas de alto grau<sup>(173,174)</sup>. A correlação desse grupo de tumores com a ocorrência de manchas café-com-leite é descrita há muito tempo e, portanto, sem surpresa, a condição hereditária mais comumente associada à sua predisposição é a neurofibromatose tipo 1. Outras condições hereditárias, como a esclerose tuberosa também são associadas aos gliomas.

Uma vez que os gliomas constituem grupo heterogêneo, qualquer comparação epidemiológica é complicada em uma amostra pequena. Tomando por base os astrocitomas pilocíticos, eles possuem idade média de 13 anos ao diagnóstico<sup>(174,187)</sup>, na amostra estudada, considerando-se apenas os pacientes de 0-18 anos (inclusive), a idade média foi 12,6 anos. Para pacientes de 19 a 35, não é possível comparação, pois a idade média em adultos situa-se em torno de 48-50 anos<sup>(187)</sup> e como a amostra aqui incluiu apenas pacientes até 35 anos, não foi possível a comparação.

A tumorigênese dos gliomas pediátricos é pouco conhecida<sup>(174)</sup>. Uma das alterações conhecidas é uma pequena duplicação em 7q34 que envolve o *locus* do gene *BRAF*, que amplifica a ativação da via RAS/RAF/MEK, via também relacionada, por exemplo, à neurofibromatose tipo 1 e à esclerose tuberosa. A mesma via parece estar ativada em adultos<sup>(174)</sup>, contudo, os gliomas pediátricos não compartilham as mesmas alterações encontradas em tumores adultos. Por exemplo, a perda de heterozigose de 1p36 e 19q13 são comuns em adultos e indicam melhor prognóstico, o que não é comumente encontrado nos tumores infantis<sup>(188)</sup>. As mutações no gene *TP53* estão presentes em até 88% dos gliomas de adultos e em apenas 5-10% dos infantis<sup>(189,190)</sup>.

Por sua vez, a MSI é uma característica mais frequente nos tumores das crianças do que naqueles dos adultos. Na literatura científica, a frequência de MSI nos gliomas infantis varia de zero a 44%, diferenças que podem não se relacionar apenas a MSI em si, mas que também podem ser devido a diferenças nos métodos para detecção de MSI<sup>(190-202)</sup>.

Viana-Pereira et al.<sup>(203)</sup>, estudando gliomas de alto grau em uma população que incluía pacientes brasileiros, compararam a presença de MSI em adultos (>32 anos, n=71) e crianças (até 23 anos, n=73), e encontraram 19,7% neste último, contra 6,8% no grupo dos adultos. O presente trabalho mostrou, na amostra total 17,5% de MSI (independente da idade), com a ressalva de que no presente estudo os pacientes não foram selecionados em função do grau do glioma. Para efeito de comparação com a mesma faixa etária do estudo citado, reagrupando os pacientes de glioma e separando-os em dois grupos (0-23; ≥23 anos), 18 pacientes foram analisados no presente trabalho com idade até 23 anos, dos quais 16,7% tinham MSI. A diferença de intervalo na faixa etária adulta e a diferença de grau dos tumores também não permite comparação precisa entre os estudos. Porém, é interessante notar que no presente estudo, 22 pacientes possuíam entre 24-35 anos e, nestes, MSI foi detectada em 18,2%, mostrando que em adultos jovens é possível que esses tumores sejam mais parecidos com os tumores infantis, não havendo diferença estatística significativa entre os dois subgrupos ( $p>0,05$ ).

Nos meduloblastomas a presença de MSI é menos estudada que nos gliomas<sup>(204)</sup>. Viana-Pereira et al.<sup>(204)</sup> em um outro estudo, similar ao já citado, mas dessa vez analisando meduloblastomas, encontraram 11% de MSI, sendo um MSI-H. Comparando com o estudo aqui apresentado é importante destacar dois pontos. O primeiro é que o trabalho citado incluiu pacientes até 72 anos de idade, com idade média de 19,5, contra 13,6 no presente estudo, e é possível que haja diferenças entre meduloblastomas que surjam após os 35 anos, assim como para os gliomas. O segundo ponto a destacar é a importância de uma comparação com valores específicos para a população estudada. Antes da elaboração de um QMVR para a população brasileira, oito pacientes (22,2%) eram considerados MSI-L. A importância dessa padronização é demonstrada, principalmente neste grupo dos meduloblastomas, no qual, com o novo padrão, cinco pacientes foram reclassificados como MSS, levando a uma frequência final de 8,3% de MSI entre esses tumores, na amostra aqui estudada.

Uma diferença importante para os trabalhos de Viana-Pereira et al.<sup>(204)</sup>, é que eles buscavam estudar genes-alvo que pudessem ser afetados pela instabilidade. Aqui não houve esse objetivo, e a pesquisa de instabilidade de microssatélites foi utilizada como ferramenta de triagem e seleção de pacientes para detecção de mutações nos genes do sistema MMR.

Um estudo parecido ao aqui apresentado foi o de Giunti et al.<sup>(162)</sup>, que analisaram uma amostra de 34 gliomas de 0-14 anos, sendo 28 de baixo e seis de alto grau. Esses autores relatam que 31 não tinham evidência de instabilidade em nenhum dos marcadores, um glioma de baixo grau tinha um alelo, considerado um alelo raro, e que poderia ser interpretado como MSI-L, e em dois casos (ambos com gliomas de alto grau) encontrou MSI-H. Tomando um desses casos de MSI-H, adicionalmente, eles compararam DNA normal e tumoral e verificaram a diferença de dois pares de base para BAT26 (113x115pb) e NR21 (106x108pb), ou um par de base para BAT25 e NR22, e chamaram atenção para o fato de que, individualmente,

devido à pequena diferença de tamanho, cada um desses *marcadores* daria a impressão de ser apenas um genótipo em heterozigose para um alelo raro não presente em outros tumores ou controles. Nesses dois pacientes com MSI-H posteriormente comprovou-se mutações bialélicas em um gene MMR.

Foi justamente esse tipo de alelo, com pequenas variações, que o presente estudo encontrou. Esse tipo de pequenas alterações também é conhecido como instabilidade tipo A (194,205). Na situação em que três de cinco marcadores são instáveis (MSI-H) é improvável a co-ocorrência de três alelos alterados, indicando um fenótipo molecular patológico que deixa pouca margem a dúvidas, como é a situação relatada nos dois casos de Giunti et al. citados acima, e como ocorre no CCR nas formas monoalélicas da SL e nos casos de silenciamento somático do *hMLH1*. Por isso, a presença de MSI-H sempre foi considerada patológica, indicativa de alteração no sistema de reparo, mesmo quando o DNA tumoral é estudado isoladamente no painel Pentaplex (sem DNA constitutivo para comparação dos alelos do DNA tumoral com o DNA normal do paciente).

Diferenciar uma variante rara (idiomorfismo) de uma patológica é um problema recorrente em genética médica, que aqui também surge na MSI-L. Quando a diferença de um par de base é significativa para indicar um estado patológico, considerando apenas um marcador? Esse é um problema que foi enfrentado no presente trabalho. Em primeiro lugar, verificou-se a importância de se adotar valores de referência apropriados para a população estudada, o que por si só, pode mudar a classificação de alguns casos de MSI-L para MSS, como já comentado na análise dos meduloblastomas.

Um outro ponto a esse respeito é mais complexo. A MSI-L sempre foi controversa. A existência de “tumores MSI-L” sempre foi questionada (178) e, em grande parte, ignorada. A observação de que famílias com mutações no *hMSH6* ou no *hPMS2* possuem, em alguns casos, fenótipos tumorais com MSI-L, fez com que fosse reconsiderada essa possibilidade. Na forma monoalélica da SL,

qualquer ambiguidade ou dúvida quanto à existência de uma instabilidade real em qualquer um dos marcadores, mesmo que por pequena diferença (1-2 pb), pode ser prontamente esclarecida testando-se o DNA de sangue periférico e comparando-se os alelos obtidos com aqueles do DNA tumoral. Se houver diferença, conclui-se, indubitavelmente, que o tumor possui marcadores instáveis. Portanto, havendo dúvida, o DNA constitutivo serve como controle normal do próprio paciente.

Na forma bialélica surge outro problema. Em alguns pacientes foi descrita a presença de MSI-L em DNA de sangue periférico<sup>(206)</sup>. Como esses pacientes possuem constitucionalmente a perda ou diminuição da atividade do sistema de reparo, isso também pode ocorrer nos leucócitos do sangue e ser detectado na análise, com isso o parâmetro de comparação se torna nebuloso.

Mais nebuloso, ainda, se torna o estudo de instabilidade de microssatélites quando se considera sua pesquisa em tumores que não sejam de cólon. Essa característica é muito bem estudada nos CCR. Em quaisquer outros tumores, mesmo quando ocorrem dentro da SL, incluindo os de endométrio (o segundo tumor mais frequente na síndrome), pouco se sabe a respeito do seu comportamento em relação a MSI e isso também vale para a identificação de genes-alvo em tumores extra-cólicos, que parecem ser diferentes daqueles encontrados no CCR. Ilustrando isso, na literatura foram encontrados dez casos do fenótipo com mutações bialélicas em que era descrito o *status* de instabilidade de microssatélites em tumores do SNC. Desses, dois eram MSS (160,167), dois MSI-L (137,168) e seis MSI-H (129,162,163,166,167). Importante notar que os MSI-H estavam geralmente associados aos gliomas de alto grau (129,162,163,166,167). Isso contrasta com os CCR no fenótipo bialélico. Em 16 relatos havia a informação de MSI no CCR, em 15 os tumores eram MSI-H (93%) e em apenas um MSI-L(120,123,139,142-146,150,153,154,159,164,166,170).

Retomando a comparação com o estudo de Giunti et al.<sup>(162)</sup>, eles encontraram dois casos de MSI-H e os testaram para mutações bialélicas.

A abordagem do estudo foi unicamente laboratorial, sem descrição clínica aprofundada. Encontraram dois pacientes com mutações bialélicas no gene *hPMS2*, o que sugeria que uma frequência de 2/34 (5,9%) entre gliomas, com esse fenótipo. Lembrando que são mutações bialélicas, o risco de recorrência em filhos de um mesmo casal é da ordem de 25% (para o fenótipo bialélico - homocigoto dominante), 50% para o fenótipo de SL clássica (entendendo-se por clássica o risco aumentado para câncer na idade adulta - heterocigoto) e 25% para a normalidade para essa característica (sem risco aumentado para câncer - homocigoto recessivo). A frequência encontrada no trabalho citado é bastante alta dentre os portadores desse tipo de tumor e, visto o risco de recorrência, traz importantes repercussões clínicas, em particular para o aconselhamento genético do casal e rastreamento de tumores em outros filhos.

Essa foi a principal preocupação e justificativa do presente trabalho, por isso foi realizada uma abordagem por meio da triagem com pesquisa de instabilidade de microssatélites não somente em gliomas mas também em meduloblastomas, e os pacientes foram subsequentemente convocados (todos com MSI-L ou MSI-H, que não foram encontrados) para avaliação clínica e posterior genotipagem. Nos pacientes estudados não foram encontrados casos de mutação deletéria nos genes *hMLH1*, *hMSH2* e *hMSH6*. Faltou o *hPMS2*. Essa é a maior limitação do presente trabalho.

Não foi omissão. O maior problema foi a amplificação do *hPMS2*. Há muito foram descritos pseudogenes e esse foi um problema subestimado no momento da concepção do projeto.

A problemática com o *hPMS2* remonta a 1995, quando Nicolaidis et al.<sup>(207)</sup> descreveram a identificação de um polimorfismo no cDNA de um paciente com síndrome de Lynch, não encontrada no seu DNA genômico, o que levantou a suspeita da presença de genes adicionais que eram amplificados com os mesmos *primers*. Esses autores fizeram um estudo que mostrou a organização genômica do *hPMS2* e descreveram sete genes relacionados que

chamaram de uma família de genes relacionada ao *hPMS2*, alguns dos quais transcritos, e denominaram-na *hPMSR* (R de “related”), localizada no cromossomo 7. Eles descreveram *primers* para esse gene que foram usados em outros trabalhos, a partir de então, e que tinham o objetivo de amplificar unicamente o *hPMS2*, particularmente os éxons 1 a 5, cujas sequências são muito similares às dos genes relacionados. Desde então, várias outras sequências homólogas foram descritas, somando um total de 20 sequências contendo um elemento específico dos pseudogenes, mas inexistente no gene<sup>(129)</sup>.

A maioria tem homologia com a região 5´, particularmente os éxons de 1 a 5, como descrito originalmente por Nicolaidis. Contudo, um pseudogene em particular, denominado *PMS2CL*, possui forte homologia com os éxons 9 e 11 a 15<sup>(129)</sup>.

Uma estratégia comum nesses casos é explorar as diferenças entre o gene e os pseudogenes no desenho de *primers* para cada éxon. E isso foi tentado para o caso do gene em questão, desde então. Todavia, mesmo com o uso de diferentes técnicas e *primers*, particularmente a região 3´ do gene (interferência com o *PMS2CL*), permanece problemática<sup>(129,208,209)</sup>. Essa é uma região com exemplos documentados de conversão gênica entre as duas sequências<sup>(210)</sup>, onde, peculiarmente, a sequência do gene pode ser introduzida no pseudogene e não há como garantir se a amplificação de fato foi do gene, ou do pseudogene<sup>(211)</sup>. O mesmo é válido para a detecção de rearranjos por MLPA nessa região. Uma estratégia que parece mais promissora seria a extração de RNA para análise da sequência<sup>(160)</sup>.

Além do problema relacionado aos pseudogenes ter sido subestimado, também houve limitação na coleta de sangue dos pacientes em quimioterapia, os quais podem ter anemia (limitando a possibilidade de coleta) e leucopenia, reduzindo a quantidade de ácidos nucleicos extraídos. Não foi planejada inicialmente a extração de RNA, apenas de DNA. Essa limitação ficou evidente ao final do projeto, pois uma das estratégias que parece ser viável para a análise do

*hPMS2* por meio do uso de RNA. Por sua vez, a limitação da coleta foi a razão de ter havido material insuficiente da paciente G6 no momento de realizar análise por MLPA. Essas são falhas difíceis de serem corrigidas em um projeto em andamento, com prazo limitado, particularmente devido a reconvocação de pacientes que moram em outras localidades e até mesmo em diferentes estados. Está programada nova entrevista com esses pacientes para informar os resultados já disponíveis e propor nova coleta, para tentar essa nova estratégia.

Outro aspecto subestimado foi o da importância do *hPMS2*. Até o momento da revisão bibliográfica inicial, existiam 11 famílias com mutação no *hPMS2*, que representavam em torno de 30% do total de famílias. Naquela ocasião, ainda que a amplificação do *hPMS2* não pudesse ser alcançada, estimava-se que a causa de 70% das famílias estaria coberta. Atualmente, esse quadro mudou. Das 67 famílias descritas, 36 (53,7%) possuem mutações referidas no *hPMS2*. Como De Vos et al.<sup>(129)</sup> demonstraram, é possível que algumas mutações descritas sejam em pseudogenes, e não no gene.

Por fim, ter por objeto uma doença que, apesar de todos os esforços médicos, pode ser letal, dificulta um estudo clínico mais aprofundado em um desenho retrospectivo. Isso ficou evidente, principalmente no grupo dos meduloblastomas. Vários dos pacientes que tinham indicação de prosseguir para a avaliação clínica já tinham falecido.

Clinicamente, duas pacientes chamaram atenção, a paciente G6 e a paciente Extra-Série, pela similaridade de suas lesões cutâneas. Se manchas café-com-leite não fossem uma lesão comum e dessem sensibilidade para indicação de teste genético, o julgamento clínico seria de que essas duas pacientes talvez tivessem a forma bialélica da síndrome. As MCL, aqui, eram mais claras, pouco numerosas, não lembrando aquelas encontradas na neurofibromatose tipo 1. A correlação entre pele e sistema nervoso é embriológica, ambos derivados da ectoderme do embrião trilaminar<sup>(212)</sup>. A ocorrência de tumores de sistema nervoso central na infância concomitantes a

um padrão de MCL e nevos pigmentados chama a atenção, não pela ocorrência das manchas em si, mas pelo padrão que se percebe quando se compara as duas pacientes, um método sujeito a falhas e talvez sem a sensibilidade e especificidade requisitada pela medicina genômica, mas um método essencial em genética clínica, a análise de padrões de anomalias congênitas.

A identificação da causa do quadro clínico dessas duas pacientes está pendente, e, portanto, a hereditariedade ainda resta ser comprovada.

Também não foi comprovada a presença de mutação deletéria em nenhum dos genes estudados para os demais pacientes. Portanto, não puderam ser alcançados dois dos objetivos do trabalho que eram a determinação da frequência das mutações e a correlação genótipo-fenótipo.

Algumas variantes foram encontradas nos três genes analisados. Com exceção de uma, elas não alteram a sequência de aminoácidos e, presumivelmente não causam doença. De fato, no banco de dados elas constam como polimorfismos inócuos, contudo, deve-se observar que alguns são comuns a quase todos os pacientes, o que poderia ser explicado justamente por se tratar de um alelo com alta frequência populacional ou, alternativamente, poderia estar relacionado à causa da doença por um mecanismo ainda desconhecido. Não existem evidências, no momento, que embasem essa última hipótese, mas deve-se sempre lembrar que a evidência de boa qualidade epidemiológica é o ponto de partida para novas descobertas e, por isso, essa informação deve ser sempre valorizada.

Quanto à variante que causa troca de aminoácido, ela foi encontrada somente em um paciente, em um dos que teve seu *status* alterado de MSI para MSS. No banco de dados essa é uma variante considerada de significado clínico incerto. Nenhum estudo associou-a ao fenótipo da doença, até o momento, mas também não há informações epidemiológicas suficientes que permitam classificá-la definitivamente como uma variante benigna. Essa situação de encontrar uma variante de significado clínico incerto é muito comum e representa

um dos grandes desafios para quem lida com a avaliação clínica das doenças hereditárias, um reflexo da falta de conhecimento de qual sua frequência nas populações e sua correlação real com a doença. Considerando-se o fato de terem sido genotipados três genes, de tamanho considerável, a identificação de todas as variantes encontradas seria visto como algo comum em uma rotina diagnóstica, o que apenas reforça a necessidade de estudos em epidemiologia genômica para que os avanços em genética possam ser traduzidos em melhores cuidados em saúde.

Para explicar o fenótipo, o mais simples é pensar na possibilidade de estar associado ao *hPMS2*. Contudo, mesmo que mutações não venham a ser encontradas no *hPMS2* nesses pacientes, quem sabe possam existir outros genes relacionados ao sistema MMR que causem a predisposição ao câncer ou, ainda, que existam epimutações não descritas. Um estudo recém-publicado vem ao encontro dessas possibilidades, um elo entre mutações e regulação epigenética, mostrando que uma marcação epigenética H3K36me3 é necessária para o recrutamento do complexo MSH2-MSH6<sup>(213)</sup>. Essa marcação aumenta nas fases G1 e S do ciclo celular, presumivelmente recrutando a atuação do sistema MMR para aumentar a fidelidade da cópia. Além disso, o estudo mostrou que células deficientes na *SETD2 trimetiltransferase de H3K36* exibem fenótipo de MSI na ausência de mutações nos genes do sistema MMR; e que algumas linhagens celulares tumorais com MSI e sem mutação nos genes do sistema MMR, possuem mutação no gene *SETD2*<sup>(213)</sup>. Ou seja, mutações em genes que direta ou indiretamente interagem com o sistema MMR podem levar a um fenótipo de MSI.

Denominar ou não o fenótipo bialélico como uma entidade clínica à parte, uma nova síndrome, também merece algumas considerações. Síndrome, em genética, é um padrão de anomalias congênitas múltiplas com etiologia conhecida ou presumida. Considerar o fenótipo uma nova “doença”, de padrão autossômico recessivo, como vem sendo referido na literatura, não parece apropriado. Analisando o fenótipo, em si, vê-se que a principal característica não é um quadro semelhante ao da neurofibromatose tipo 1

(até porque nem todos os pacientes o possuem), mas a predisposição ao câncer. Em termos dessa predisposição, o espectro de tumor que ocorre nas formas bialélicas é o mesmo que ocorre na SL típica, com a ressalva de que os tumores ocorrem mais precocemente e para alguns sítios (como os de SNC) com maior frequência do que se veria na forma monoalélica. Isso constitui um quadro clínico novo, um fenótipo novo, ou apenas um fenótipo mais grave? Como dito, interpretar o quadro de MCL como o fenótipo principal parece equivocado. Dar um novo nome de síndrome, de padrão de herança autossômico recessivo, pode ter o benefício de trazer um maior conhecimento (*awareness*) para os profissionais que lidam com câncer na faixa etária infantil, mas por outro lado cria uma confusão conceitual. Se a herança é autossômica recessiva, então, por que o risco aumentado de câncer nos pais portadores de mutações monoalélicas? E o risco, também existente, para os tios e os avós? O conhecimento em genética molecular às vezes cria confusões nos conceitos anteriores e parece ser o caso aqui. Herança bialélica não é sinônimo de herança autossômica recessiva. O primeiro parte de um conhecimento molecular, o segundo parte de um conhecimento do fenótipo e baseia-se em genética mendeliana clássica. É possível a conciliação das duas abordagens. Considerando como o principal fenótipo a predisposição ao câncer, existe apenas uma síndrome, a SL, causada por mutações nos genes do sistema MMR, com padrão de herança autossômico dominante, com dominância incompleta e penetrância em torno de 70%. Dizer isso é dizer que nem todos que tenham as mutações desenvolverão a doença (penetrância incompleta) e é dizer que o homocigoto dominante (o que tem mutações bialélicas) terá um fenótipo mais grave que o heterocigoto (o que tem mutações monoalélicas, que possui um fenótipo intermediário) que por sua vez terá um risco de câncer muito maior que o verdadeiro homocigoto recessivo (quem tem o genótipo *wild type* nos dois alelos). Como se vê, é apenas uma questão conceitual, que concilia o mendeliano com o molecular, com a proporção esperada de 1:2:1. Isso é dominância incompleta. Algo ensinado nos cursos de biologia, mas que parece esquecido entre quem lida com genética médica e humana.

Considerando a importância do reconhecimento do fenótipo bialélico da SL no aconselhamento genético e na prevenção secundária do câncer, bem como o reconhecimento da presença de MSI em uma proporção significativa da amostra estudada, novos trabalhos deveriam ser realizados para aprofundar esse tema. Idealmente deveria ser delineado em uma coorte prospectiva e, talvez, para aumentar a sensibilidade no grupo dos gliomas, trabalhar apenas com gliomas de alto grau e meduloblastomas.





## **6- CONCLUSÃO**



A pesquisa aqui apresentada mostrou que, dos pacientes de zero a 35 anos, 8,3% daqueles com meduloblastomas e 17,5% daqueles com gliomas apresentavam instabilidade de microssatélites.

Não foram identificados pacientes com mutações deletérias nos genes hMLH1, hMSH2 e hMSH6 naqueles que participaram da avaliação clínica. A estimativa de sua frequência e sua caracterização genético-clínica ficam, portanto, prejudicadas.

É necessário que sejam realizados estudos adicionais, preferencialmente prospectivos, para estabelecer a frequência de mutações nos genes do sistema MMR nos pacientes pediátricos e adultos jovens com tumores de sistema nervoso central e instabilidade de microssatélites, uma questão importante para o aconselhamento genético e, possivelmente, para implantação de uma rotina de rastreamento com pesquisa de MSI nessa população de pacientes.





## **7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**



1. Warkany J. Congenital Malformations - Notes and Comments. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1971.
2. Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. Neoplasia. In: Cotran RS, Kumar V, Robbins SL, editors. Robbins Pathologic Basis of Disease. 4 ed. Philadelphia: WB Saunders; 1989. pp. 239–305.
3. Kinzler KW, Vogelstein B, editors. The Genetic Basis of Human Cancer. New York: McGraw-Hill; 2002.
4. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. Cell. 2000.
5. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. N Engl J Med. 2002;347(20):1593–603.
6. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. Int J Cancer. 2010;127(12):2893–917.
7. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. Int J Cancer. 2013;132(5):1133–45.
8. BRASIL. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA. Rio de Janeiro: INCA; 2011.
9. BRASIL. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA. Rio de Janeiro: INCA; 2003.
10. BRASIL. Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil. Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Câncer - INCA. Rio de Janeiro: INCA; 2005.
11. Willett WC, Stampfer MJ, Colditz GA, Rosner BA, Speizer FE. Relation of meat, fat, and fiber intake to the risk of colon cancer in a prospective study among women. N Engl J Med. 1990;323(24):1664–72.
12. Boyle P, Langman JS. ABC of colorectal cancer: epidemiology. BMJ. 2000;321(7264):805–8.

13. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clin Genet*. 2009;76(1):1–18.
14. Boardman LA. Heritable colorectal cancer syndromes: recognition and preventive management. *Gastroenterol Clin North Am*. 2002;31:1107–31.
15. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomaki P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*. 1998;338(21):1481–7.
16. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Feasibility of Screening for Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5783–8.
17. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology*. 1993;104:1535–49.
18. Vasen HF, Offerhaus GJ, Hartog Jager den 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. *Int J Cancer*. 1990;46:31–4.
19. Moslein G, Krause-Paulus R, Hegger R, Peterschulte G, Vogel T. Clinical aspects of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann N Y Acad Sci*. 2000;910:75–83; discussion 83–4.
20. Lynch HT. Historical Aspects of Lynch Syndrome. In: Rodriguez-Bigas MA, Cutait R, Lynch PM, Tomlinson I, Vasen HF, editors. *Hereditary Colorectal Cancer*. Springer; 2010.
21. Douglas JA, Gruber SB, Meister KA, Bonner J, Watson P, Krush AJ, et al. History and molecular genetics of Lynch syndrome in family G: a century later. *JAMA*. 2005;294(17):2195–202.

22. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma: as shown by the study of the cases examined in the pathological laboratory of the University of Michigan, 1895-1913. *Arch Intern Med. Am Med Assoc*; 1913;12(5):546.
23. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, Larsen AL, Krush AJ. Hereditary factors in cancer. Study of two large midwestern kindreds. *Arch Intern Med.* 1966;117(2):206–12.
24. Lynch HT, Krush AJ. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. *Cancer.* 1971;27:1505–11.
25. Resta RG. Defining and redefining the scope and goals of genetic counseling. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2006;142C(4):269–75.
26. Lynch HT, Boland CR, Gong G, Shaw TG, Lynch PM, Fodde R, et al. Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet.* 2006; 14(4):390–402.
27. Lindor NM, McMaster ML, Lindor CJ, Greene MH. Concise Handbook of Familial Cancer Susceptibility Syndromes - Second Edition. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2008;2008(38):3–93.
28. Vasen HFA, Moslein G, Alonso A, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, et al. Guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (hereditary non-polyposis cancer). *J Med Genet.* 2007;44(6):353–62.
29. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol.* 1994;145(1):148–56.
30. Peltomäki P, Sistonen P, Mecklin JP, Pylkkänen L, Aaltonen L, Nordling S, et al. Evidence that the MCC-APC gene region in 5q21 is not the site for susceptibility to hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer Res.* 1992;52(16):4530–3.

31. Peltomaki P, Lothe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res.* 1993;53:5853–5.
32. Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science.* 1993;260(5109):812–6.
33. 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.
34. Strachan T, Read A. *Human Molecular Genetics.* 4 ed. New York: Garland Science; 2010.
35. Umar A, Risinger JI, Hawk ET, Barrett JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer.* 2004;4(2):153–8.
36. Levinson G, Gutman GA. High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Res.* 1987;15(13):5323–38.
37. Reenan RA, Kolodner RD. Isolation and characterization of two *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding homologs of the bacterial HexA and MutS mismatch repair proteins. *Genetics.* 1992;132(4):963–73.
38. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, Petes TD. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature.* 365:274–6.
39. Leach FS, Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell.* 1993;75(6):1215–25.

40. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH 1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature*. 1994;368(6468):258–61.
41. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science*. 1994;263(5153):1625–9.
42. Nicolaidis NC, Papadopoulos N, Liu B, Weit YF, Carter KC, Ruben SM, et al. Mutations of two P/WS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature*. 1994;371(6492):75–80.
43. Papadopoulos N, Nicolaidis NC, Liu B, Parsons R, Lengauer C, Palombo F, et al. Mutations of GTBP in genetically unstable cells. *Science*. 1995;268(5219):1915–7.
44. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, Banerjee-Basu S, Baxevanis AD, Lynch HT, et al. MLH3: a DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet*. 2000;24(1):27–35.
45. Lynch HT, Lynch J. Lynch syndrome: genetics, natural history, genetic counseling, and prevention. *J. Clin. Oncol*. 2000;18(21 Suppl):19S–31S.
46. Harfe BD, Jinks-Robertson S. DNA mismatch repair and genetic instability. *Annu Rev Genet*. 2000;34(1):359–99.
47. Hsieh P, Yamane K. DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mechanisms of Ageing and Development*. 2008;129(7-8):391–407.
48. Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL. DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev*. 2006;106(2):302–23.
49. Kunkel TA, Erie DA. DNA mismatch repair. *Ann Rev Biochem*. 2005;74(1):681–710.

50. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM. The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer*. 2008;7(1):41–52.
51. Martín-López JV, Fishel R. The mechanism of mismatch repair and the functional analysis of mismatch repair defects in Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2013;12(2):159-68.
52. Preston BD, Albertson TM, Herr AJ. DNA replication fidelity and cancer. *Semin Cancer Biol*. 2010;20(5):281–93.
53. Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, et al. hMSH2 forms specific mispair-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci. U.S.A.* 1996;93(24):13629–34.
54. Gradia S, Subramanian D, Wilson T, Acharya S, Makhov A, Griffith J, et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell*. 1999;3(2):255–61.
55. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2073–3.
56. Sinicrope FA, Sargent DJ. Molecular pathways: microsatellite instability in colorectal cancer: prognostic, predictive, and therapeutic implications. *Clin Cancer Res*. 2012;18(6):1506–12.
57. Duval A, Hamelin R. Mutations at coding repeat sequences in mismatch repair-deficient human cancers: toward a new concept of target genes for instability. *Cancer Res*. 2002;62(9):2447–54.
58. Woerner SM, Kloor M, Mueller A, Rueschoff J, Friedrichs N, Buettner R, et al. Microsatellite instability of selective target genes in HNPCC-associated colon adenomas. *Oncogene*. 2005;24(15):2525–35.
59. Xie J, Guillemette S, Peng M, Gilbert C, Buermeyer A, Cantor SB. An MLH1 mutation links BACH1/FANCD1 to colon cancer, signaling, and insight toward directed therapy. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(11):1409–16.

60. Peltomäki P, Vasen H. Mutations associated with HNPCC predisposition -- Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers*. 2004;20(4):269–76.
61. Lynch HT, la Chapelle de A. Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919–32.
62. Peltomäki P. Role of DNA mismatch repair defects in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21(6):1174–9.
63. Senter L, Clendenning M, Sotamaa K, Hampel H, Green J, Potter JD, et al. The clinical phenotype of Lynch syndrome due to germ-line PMS2 mutations. *Gastroenterology*. 2008;135(2):419–428.
64. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, et al. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005;352(18):1851–60.
65. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, Chapelle ADL, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite Instability. *J Natl Cancer Inst*. 2004;96(4):261–8.
66. Boland CR. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. In: Kinzler KW, Vogelstein B, editors. *The Genetic Basis of Human Cancer*. New York: McGraw-Hill; 2002.
67. Lindor NM. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005;293(16):1979–85.
68. Boland CR. Clinical uses of microsatellite instability testing in colorectal cancer: an ongoing challenge. *J Clin Oncol*. 2007;25(7):754–6.
69. Domingo E, Niessen RC, Oliveira C, Alhopuro P, Moutinho C, Espín E, et al. BRAF-V600E is not involved in the colorectal tumorigenesis of HNPCC in patients with functional MLH1 and MSH2 genes. *Oncogene*. 2005;24(24):3995–8.

70. Loughrey MB, Waring PM, Tan A, Trivett M, Kovalenko S, Beshay V, et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Fam Cancer*. 2007;6(3):301–10.
71. Parsons MT, Buchanan DD, Thompson B, Young JP, Spurdle AB. Correlation of tumour BRAF mutations and MLH1 methylation with germline mismatch repair (MMR) gene mutation status: a literature review assessing utility of tumour features for MMR variant classification. *J Med Genet*. 2012;49(3):151–7.
72. Klarskov L, Ladelund S, Holck S, Roenlund K, Lindebjerg J, Elebro J, et al. Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining. *Hum Pathol*. 2010;41(10):1387–96.
73. 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 Res*. 1998;58:5248-5257.
74. Suraweera N. Evaluation of tumor microsatellite instability using five quasimonomorphic mononucleotide repeats and pentaplex PCR. *Gastroenterology*. 2002;123(6):1804–11.
75. Findeisen P. T25 repeat in the 3' untranslated region of the CASP2 gene: a sensitive and specific marker for microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res*. 2005;65(18):8072–8.
76. Wong YF, Cheung TH, Lo KW, Yim SF, Chan LK, Buhard O, et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis*. 2006;27(5):951–5.
77. Goel A, Nagasaka T, Hamelin R, Boland CR. An optimized pentaplex PCR for detecting DNA mismatch repair-deficient colorectal cancers. *PLoS ONE*. 2010;5(2):e9393.

78. Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. 2013;62(6):812–23.
79. Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the MLH1 gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res*. 2002;62(14):3925–8.
80. Miyakura Y, Sugano K, Akasu T, Yoshida T, Maekawa M, Saitoh S, et al. Extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in early-onset sporadic colon cancers with microsatellite instability. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2004;2(2):147–56.
81. Suter CM, Martin DI, Ward RL. Germline epimutation of MLH1 in individuals with multiple cancers. *Nat Genet*. 2004;36(5):497–501.
82. Hitchins M, Williams R, Cheong K, Halani N, Lin VA, Packham D, et al. MLH1 Germline Epimutations as a Factor in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2005;129(5):1392–9.
83. Martin DI, Ward R, Suter CM. Germline Epimutation: A Basis for Epigenetic Disease in Humans. *Ann N Y Acad Sci*. 2005;1054(1):68–77.
84. Valle L, Carbonell P, Fernandez V, Dotor AM, Sanz M, Benítez J, et al. MLH1 germline epimutations in selected patients with early-onset non-polyposis colorectal cancer. *Clin Genet*. 2007;71(3):232–7.
85. Hitchins MP, Ward RL. Constitutional (germline) MLH1 epimutation as an aetiological mechanism for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 2009;46(12):793–802.

86. Goel A, Nguyen TP, Leung HC, Nagasaka T, Rhee J, Hotchkiss E, et al. De novo constitutional MLH1 epimutations confer early-onset colorectal cancer in two new sporadic Lynch syndrome cases, with derivation of the epimutation on the paternal allele in one. *Int J Cancer*. 2010;128(4):869–78.
87. Pineda M, Mur P, Iniesta MD, Borrás E, Campos O, Vargas G, et al. MLH1 methylation screening is effective in identifying epimutation carriers. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(12):1256–64.
88. Hall JG. The importance of the fetal origins of adult disease for geneticists. *Clin Genet*. 2007;72(2):67–73.
89. Hitchins MP, Wong JJ, Suthers G, Suter CM, Martin DI, Hawkins NJ, et al. Inheritance of a cancer-associated MLH1 germ-line epimutation. *N Engl J Med*. 2007;356(7):697–705.
90. Hitchins MP. Inheritance of Epigenetic Aberrations (Constitutional Epimutations) in Cancer Susceptibility. In: Herceg Z, Ushijima T, editors. *Epigenetics and Cancer, Part A*. Academic Press; 2010. pp. 201–43.
91. Crépin M, Dieu MC, Lejeune S, Escande F, Boidin D, Porchet N, et al. Evidence of constitutional MLH1 epimutation associated to transgenerational inheritance of cancer susceptibility. *Hum Mutat*. 2011;33(1):180–8.
92. Valle L, Carbonell P, Fernandez V, Dotor AM, Sanz M, Benítez J, et al. MLH1 germline epimutations in selected patients with early-onset non-polyposis colorectal cancer. *Clin Genet*. 2007;71(3):232–7.
93. Chan TL, Yuen ST, Kong CK, Chan YW, Chan AS, Ng WF, et al. Heritable germline epimutation of MSH2 in a family with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet*. 2006;38(10):1178–83.
94. Chong SS, Youngson NA, Whitelaw E. Heritable germline epimutation is not the same as transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Genet*. 2007;39(5):574–6.

95. Suter CM, Martin DI. Inherited epimutation or a haplotypic basis for the propensity to silence? *Nat Genet.* 2007;39(5):573–6.
96. Horsthemke B. Heritable germline epimutations in humans. *Nat Genet.* 2007;39(5):573–4, author reply 575–6.
97. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Geurts van Kessel A, Hoogerbrugge N. EPCAM deletion carriers constitute a unique subgroup of Lynch syndrome patients. *Fam Cancer.* 2013;12(2):169-74.
98. Kempers MJ, Kuiper RP, Ockeloen CW, Chappuis PO, Hutter P, Rahner N, et al. Risk of colorectal and endometrial cancers in EPCAM deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet Oncol.* 2011;12(1):49–55.
99. Niessen RC, Hofstra RM, Westers H, Ligtenberg MJ, Kooi K, Jager PO, et al. Germline hypermethylation of MLH1 and EPCAM deletions are a frequent cause of Lynch syndrome. *Genes Chromosomes Cancer.* 2009;48(8):737–44.
100. Perez-Cabornero L, Sanz M, Sampedro E, Aras E, Acedo Becares A, Miner Pino C, et al. Frequency of Rearrangements in Lynch Syndrome Cases Associated with MSH2: Characterization of a New Deletion Involving both EPCAM and the 5' Part of MSH2. *Cancer Prev Res (Phila).* 2011;4(10):1556–62.
101. Hitchins MP. The role of epigenetics in Lynch syndrome. *Fam Cancer.* 2013;12(2):189-205.
102. Koornstra JJ, Mourits MJ, Sijmons RH, Leliveld AM, Hollema H, Kleibeuker JH. Management of extracolonic tumours in patients with Lynch syndrome. *Lancet Oncol.* 2009;10(4):400–8.
103. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, et al. Risks of Lynch Syndrome Cancers for MSH6 Mutation Carriers. *J Natl Cancer Inst.* 2010;102(3):193–201.

104. 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.* 2004;10(3):972–80.
105. Truninger K, Menigatti M, Luz J, Russell A, Haider R, Gebbers JO, et al. Immunohistochemical analysis reveals high frequency of PMS2 defects in colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1160–71.
106. Hendriks YM, Jagmohan Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijenbroek M, Tops C, et al. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology.* 2006;130(2):312–22.
107. Worthley DL, Walsh MD, Barker M, Ruzskiewicz A, Bennett G, Phillips K, et al. Familial mutations in PMS2 can cause autosomal dominant hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005;128(5):1431–6.
108. Jenkins MA. Role of MSH6 and PMS2 in the DNA mismatch repair process and carcinogenesis. *Surg Oncol Clinics N Am.* 2009;18(4):625–36.
109. Vaughn CP, Baker CL, Samowitz WS, Swensen JJ. The frequency of previously undetectable deletions involving 3' Exons of the PMS2 gene. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013;52(1):107–12.
110. Turcot J, Despres JP, St Pierre F. Malignant tumors of the central nervous system associated with familial polyposis of the colon: report of two cases. *Dis Colon Rectum.* 1959;2:465–8.
111. McKusick VA. Genetic factors in intestinal polyposis. *JAMA.* 1962;182(3):271–7.
112. Lewis JH, Ginsberg AL, Toomey KE. Turcot's syndrome. Evidence for autosomal dominant inheritance. *Cancer.* 1983;51(3):524–8.

113. Itoh H, Ohsato K. Turcot syndrome and its characteristic colonic manifestations. *Dis Colon Rectum*. 1985;28:399–402.
114. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG. Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol*. 1997;15(7):2744–58.
115. Wang Q, Lasset C, Desseigne F, Frappaz D, Bergeron C, Navarro C, et al. Neurofibromatosis and early onset of cancers in hMLH1-deficient children. *Cancer Res*. 1999;59(2):294–7.
116. Ricciardone MD, Özçelik T, Cevher B, Özdağ H, Tuncer M, Gürgey A, et al. Human MLH1 deficiency predisposes to hematological malignancy and neurofibromatosis type 1. *Cancer Res*. 1999;59(2):290–3.
117. De Rosa M, Fasano C, Panariello L, Scarano MI, Belli G, Iannelli A, et al. Evidence for a recessive inheritance of Turcot's syndrome caused by compound heterozygous mutations within the PMS2 gene. *Oncogene*. 2000;19(13):1719–23.
118. Felton KEA, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair. *Clin Genet*. 2007;71(6):483–98.
119. Hackman P, Tannergård P, Osei-Mensa S, Chen J, Kane MF, Kolodner R, et al. A human compound heterozygote for two MLH1 missense mutations. *Nat Genet*. 1997;17(2):135–6.
120. Liu T, Tannergård P, Hackman P, Rubio C, Kressner U, Lindmark G, et al. Missense mutations in hMLH1 associated with colorectal cancer. *Hum Genet*. 1999;105(5):437–41.
121. Wang Q, Montmain G, Ruano E, Upadhyaya M, Dudley S, Liskay RM, et al. Neurofibromatosis type 1 gene as a mutational target in a mismatch repair-deficient cell type. *Hum Genet*. 2003;112(2):117–23.
122. Bertholon J, Wang Q, Galmarini CM, Puisieux A. Mutational targets in colorectal cancer cells with microsatellite instability. *Fam Cancer*. 2006;5(1):29–34.

123. Trimbath JD, Petersen GM, Erdman SH, Ferre M, Luce MC, Giardiello FM. Café-au-lait spots and early onset colorectal neoplasia: a variant of HNPCC? *Fam Cancer*. 2001;1(2):101–5.
124. Shalon L, Markowitz J, Bialer M, Kahn E, Weinblatt M, Giardiello FM, et al. Ovarian neoplasm and endometrioid carcinoma in a patient with Turcot syndrome. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1997;25(2):224–7.
125. Vilkki S, Tsao JL, Loukola A, Pöyhönen M, Vierimaa O, Herva R, et al. Extensive somatic microsatellite mutations in normal human tissue. *Cancer Res*. 2001;61(11):4541-4.
126. Whiteside D, McLeod R, Graham G, Steckley JL, Booth K, Somerville MJ, et al. A homozygous germ-line mutation in the human MSH2 gene predisposes to hematological malignancy and multiple café-au-lait spots. *Cancer Res*. 2002;62(2):359–62.
127. Wagner A, Reddinguis R, Kros J. Wilms tumor and glioblastoma in a child with a double MLH1 germline mutation. *Fam Cancer*. 2003;2(S1):57.
128. Poley JW, Wagner A, Hoogmans MM, Menko FH, Tops C, Kros JM, et al. Biallelic germline mutations of mismatch-repair genes: a possible cause for multiple pediatric malignancies. *Cancer*. 2007;109(11):2349–56.
129. De Vos M, Hayward BE, Picton S, Sheridan E, Bonthron DT. Novel PMS2 pseudogenes can conceal recessive mutations causing a distinctive childhood cancer syndrome. *Am J Hum Genet*. 2004;74(5):954–64.
130. Hamilton SR, Liu B, Parsons RE, Papadopoulos N, Jen J, Powell SM, et al. The molecular basis of Turcot's syndrome. *N Engl J Med*. 1995;332(13):839–47.
131. Taylor MD, Perry J, Zlatescu MC, Stemmer-Rachamimov AO, Ang LC, Ino Y, et al. The hPMS2 exon 5 mutation and malignant glioma. Case report. *Journal of Neurosurgery*. 1999;90(5):946–50.

132. De Vos M, Hayward BE, Charlton R, Taylor GR, Glaser AW, Picton S, et al. PMS2 mutations in childhood cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2006;98(5):358–61.
133. Tithecott GA, Filler R, Sherman PM. Turcot's syndrome: a diagnostic consideration in a child with primary adenocarcinoma of the colon. *J Pediatr Surg.* 1989;24(11):1189–91.
134. Gallinger S, Aronson M, Shayan K, Ratcliffe EM, Gerstle JT, Parkin PC, et al. Gastrointestinal cancers and neurofibromatosis type 1 features in children with a germline homozygous MLH1 mutation. *Gastroenterology.* 2004;126(2):576–85.
135. Durno C, Aronson M, Bapat B, Cohen Z, Gallinger S. Family history and molecular features of children, adolescents, and young adults with colorectal carcinoma. *Gut.* 2005;54(8):1146–50.
136. Rey JM, Noruzinia M, Brouillet JP, Sarda P, Maudelonde T, Pujol P. Six novel heterozygous MLH1, MSH2, and MSH6 and one homozygous MLH1 germline mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Genet Cytogenet.* 2004;155(2):3–3.
137. Menko FH, Kaspers GL, Meijer GA, Claes K, van Hagen JM, Gille JJP. A homozygous MSH6 mutation in a child with café-au-lait spots, oligodendroglioma and rectal cancer. *Fam Cancer.* 2004;3(2):123–7.
138. Raevaara TE, Gerdes AM, Lönnqvist KE, Tybjaerg-Hansen A, Abdel-Rahman WM, Kariola R, et al. HNPCC mutation MLH1 P648S makes the functional protein unstable, and homozygosity predisposes to mild neurofibromatosis type 1. *Genes Chromosomes Cancer.* 2004;40(3):261–5.
139. Agostini M, Tibiletti MG, Lucci-Cordisco E, Chiaravalli A, Morreau H, Furlan D, et al. Two PMS2 mutations in a Turcot syndrome family with small bowel cancers. *Am J Gastroenterol.* 2005;100(8):1886–91.

140. Hegde MR. A Homozygous Mutation in MSH6 Causes Turcot Syndrome. *Clinical Cancer Res.* 2005;11(13):4689–93.
141. Ostergaard JR, Sunde L, Okkels H. Neurofibromatosis von Recklinghausen type I phenotype and early onset of cancers in siblings compound heterozygous for mutations in MSH6. *Am J Med Genet A.* 2005;139A(2):96–6.
142. Marcos I, Borrego S, Urioste M, García-Vallés C, Antiñolo G. Mutations in the DNA mismatch repair gene MLH1 associated with early-onset colon cancer. *J Pediatr.* 2006;148(6):837–9.
143. Müller A, Schackert HK, Lange B, Rüschoff J, Füzési L, Willert J, et al. A novel MSH2 germline mutation in homozygous state in two brothers with colorectal cancers diagnosed at the age of 11 and 12 years. *Am J Med Genet A.* 2006;140(3):195–9.
144. Plaschke J, Linnebacher M, Kloor M, Gebert J, Cremer FW, Tinschert S, et al. Compound heterozygosity for two MSH6 mutations in a patient with early onset of HNPCC-associated cancers, but without hematological malignancy and brain tumor. *Eur J Hum Genet.* 2006;14(5):561–6.
145. Will O, Carvajal-Carmona LG, Gorman P, Howarth KM, Jones AM, Polanco-Echeverry GM, et al. Homozygous PMS2 deletion causes a severe colorectal cancer and multiple adenoma phenotype without extraintestinal cancer. *Gastroenterology.* 2007;132(2):527–30.
146. Auclair J, Leroux D, Desseigne F, Lasset C, Saurin JC, Joly MO, et al. Novel biallelic mutations in MSH6 and PMS2 genes: gene conversion as a likely cause of PMS2 gene inactivation. *Hum Mutat.* 2007;28(11):1084–90.
147. Scott RH, Mansour S, Pritchard-Jones K, Kumar D, MacSweeney F, Rahman N. Medulloblastoma, acute myelocytic leukemia and colonic carcinomas in a child with biallelic MSH6 mutations. *Nat Clin Prac Oncol.* 2007;4(2):130–4.

148. Scott RH, Homfray T, Huxter NL, Mitton SG, Nash R, Potter MN, et al. Familial T-cell non-Hodgkin lymphoma caused by biallelic MSH2 mutations. *J Med Genet.* 2007;44(7):e83–3.
149. Marafie MJ, Al-Awadi S, Al-Mosawi F, Elshafey A, Al-Ali W, Al-Mulla F. Impact of 226C>T MSH2 gene mutation on cancer phenotypes in two HNPCC-associated highly-consanguineous families from Kuwait: emphasis on premarital genetic testing. *Fam Cancer.* 2009;8(4):289–98.
150. Krüger S, Kinzel M, Walldorf C, Gottschling S, Bier A, Tinschert S, et al. Homozygous PMS2 germline mutations in two families with early-onset haematological malignancy, brain tumours, HNPCC-associated tumours, and signs of neurofibromatosis type 1. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(1):62–72.
151. Gottschling S, Reinhard H, Pagenstecher C, Krüger S, Raedle J, Plotz G, et al. Hypothesis: Possible role of retinoic acid therapy in patients with biallelic mismatch repair gene defects. *Eur J Pediatr.* 2008;167(2):225–9.
152. Kratz CP, Niemeyer CM, Jüttner E, Kartal M, Weninger A, Schmitt-Graeff A, et al. Childhood T-cell non-Hodgkin's lymphoma, colorectal carcinoma and brain tumor in association with café-au-lait spots caused by a novel homozygous PMS2 mutation. *Leukemia.* 2008;22(5):1078–80.
153. Jackson CC, Holter S, Pollett A, Clendenning M, Chou S, Senter L, et al. Café-au-lait macules and pediatric malignancy caused by biallelic mutations in the DNA mismatch repair (MMR) gene PMS2. *Pediatr Blood Cancer.* 2008;50(6):1268–70.
154. Gururangan S, Frankel W, Broaddus R, Clendenning M, Senter L, McDonald M, et al. Multifocal anaplastic astrocytoma in a patient with hereditary colorectal cancer, transcobalamin II deficiency, agenesis of the corpus callosum, mental retardation, and inherited PMS2 mutation. *Neuro Oncol.* 2008;10(1):93–7.

155. Tan TY, Orme LM, Lynch E, Croxford MA, Dow C, Dewan PA, et al. Biallelic PMS2 mutations and a distinctive childhood cancer syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 2008;30(3):254–7.
156. Roy S, Raskin L, Raymond VM, Thibodeau SN, Mody RJ, Gruber SB. Pediatric duodenal cancer and biallelic mismatch repair gene mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2009;53(1):116–20.
157. Wimmer K, Etzler J. Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet*. 2008;124(2):105–22.
158. Kratz CP, Holter S, Etzler J, Lauten M, Pollett A, Niemeyer CM, et al. Rhabdomyosarcoma in patients with constitutional mismatch-repair-deficiency syndrome. *J Med Genet*. 2009;46(6):418–20.
159. Rahner N, Höefler G, Högenauer C, Lackner C, Steinke V, Sengteller M, et al. Compound heterozygosity for two MSH6 mutations in a patient with early onset colorectal cancer, vitiligo and systemic lupus erythematosus. *Am J Med Genet A*. 2008;146A(10):1314–9.
160. Etzler J, Peyrl A, Zatkova A, Schildhaus H-U, Ficek A, Merkelbach-Bruse S, et al. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. *Hum Mutat*. 2008;29(2):299–305.
161. Sjursen W, Bjørnevoll I, Engebretsen LF, Fjelland K, Halvorsen T, Myrvold HE. A homozygote splice site PMS2 mutation as cause of Turcot syndrome gives rise to two different abnormal transcripts. *Fam Cancer*. 2009;8(3):179–86.
162. Giunti L, Cetica V, Ricci U, Giglio S, Sardi I, Paglierani M, et al. Type A microsatellite instability in pediatric gliomas as an indicator of Turcot syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(7):919–27.

163. Toledano H, Goldberg Y, Kedar-Barnes I, Baris H, Porat RM, Shochat C, et al. Homozygosity of MSH2 c.1906G-->C germline mutation is associated with childhood colon cancer, astrocytoma and signs of Neurofibromatosis type I. *Fam Cancer*. 2009;8(3):187–94.
164. Kets CM, Hoogerbrugge N, van Krieken JH, Goossens M, Brunner HG, Ligtenberg MJ. Compound heterozygosity for two MSH2 mutations suggests mild consequences of the initiation codon variant c.1A>G of MSH2. *Eur J Hum Genet*. 2009;17(2):159–64.
165. Ripperger T, Beger C, Rahner N, Sykora KW, Bockmeyer CL, Lehmann U, et al. Constitutional mismatch repair deficiency and childhood leukemia/lymphoma--report on a novel biallelic MSH6 mutation. *Haematologica*. 2010;95(5):841–4.
166. Herkert JC, Niessen RC, Olderode-Berends MJ, Veenstra-Knol HE, Vos YJ, van der Klift HM, et al. Paediatric intestinal cancer and polyposis due to bi-allelic PMS2 mutations: Case series, review and follow-up guidelines. *Eur J Cancer*. 2011;47(7):965–82.
167. Leenen C, Geurts-Giele W, Dubbink HJ, Reddingius R, van den Ouweland AM, Tops C, et al. Pitfalls in molecular analysis for mismatch repair deficiency in a family with biallelic pms2 germline mutations. *Clin Genet*. 2011;80(6):558–65.
168. Ilencikova D, Sejnova D, Jindrova J, Babal P. High-grade brain tumors in siblings with biallelic MSH6 mutations. *Pediatr Blood Cancer*. 2011;57(6):1067–70.
169. Allred RJ, Samowitz W. Constitutional Mismatch Repair-Deficiency Syndrome. *Pathology Case Reviews*. 2013;18(2):79–80.
170. Vasovcak P, Krepelova A, Menigatti M, Puchmajerova A, Skapa P, Augustinakova A, et al. Unique mutational profile associated with a loss of TDG expression in the rectal cancer of a patient with a constitutional PMS2 deficiency. *DNA Repair (Amst)*. 2012;11(7):616–23.

171. Baas AF, Gabbett M, Rimac M, Kansikas M, Raphael M, Nivelstein RA, et al. Agenesis of the corpus callosum and gray matter heterotopia in three patients with constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2013;21(1):55–61.
172. Yeung JT, Pollack IF, Shah S, Jaffe R, Nikiforova M, Jakacki RI. Optic pathway glioma as part of a constitutional mismatch-repair deficiency syndrome in a patient meeting the criteria for neurofibromatosis type 1. *Pediatr Blood Cancer.* 2013;60(1):137–9.
173. Gupta N, Banerjee A, Haas-Kogan D, editors. *Pediatric CNS Tumors.* 2nd ed. Springer; 2010.
174. Sievert AJ, Fisher MJ. Pediatric low-grade gliomas. *J Child Neurol.* 2009;24(11):1397–408.
175. Gardes P, Forveille M, Alyanakian MA, Aucouturier P, Ilencikova D, Leroux D, et al. Human MSH6 deficiency is associated with impaired antibody maturation. *J Immunol.* 2012;188(4):2023–9.
176. Bandipalliam P. Syndrome of early onset colon cancers, hematologic malignancies & features of neurofibromatosis in HNPCC families with homozygous mismatch repair gene mutations. *Fam Cancer.* 2005;4(4):323–33.
177. Felton KEA, Gilchrist DM, Andrew SE. Constitutive deficiency in DNA mismatch repair: is it time for Lynch III? *Clin Genet.* 2007;71(6):499–500.
178. Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimonomorphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers.* 2004;20(4-5):251–7.
179. Kurzawski G, Safranow K, Suchy J, Chlubek D, Scott RJ, Lubinski J. Mutation analysis of MLH1 and MSH2 genes performed by denaturing high-performance liquid chromatography. *J Biochem Biophys Methods.* 2002; 51(1):89–100.

180. Hegde M, Blazo M, Chong B, Prior T, Richards C. Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2005;7(4):525–34.
181. Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, Van Schooten RJ, Dommering CJ, et al. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer*. 2002; 87(8):892–7.
182. Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, Dunnen den JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Hum Mutat*. 2011; 32(5):557–63.
183. Fokkema IF, Dunnen den JT, editors. Leiden Open Variation Database [Internet]. Leiden University Medical Center; [Acesso em 2 de jun de 2013]. Disponível em: URL: <http://www.lovd.nl>
184. Leiden University Medical Center, InSiGHT. Colon Cancer Gene Variants Databases - Leiden Open Variation Database [Internet]. [chromium.liacs.nl](http://chromium.liacs.nl). [Acesso em 2 de jun de 2013]. Disponível em: URL: [http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon\\_cancer/home.php](http://chromium.liacs.nl/LOVD2/colon_cancer/home.php)
185. Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, Flejou JF, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24(2):241–51.
186. Patil DT, Bronner MP, Portier BP, Fraser CR, Plesec TP, Liu X. A five-marker panel in a multiplex PCR accurately detects microsatellite instability-high colorectal tumors without control DNA. *Diagn Mol Pathol*. 2012;21(3):127–33.
187. Dolecek TA, Propp JM, Stroup NE, Kruchko C. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2005–2009. *Neuro Oncol*. 2012;14(suppl 5):v1–v49.

188. Mariani L, Deiana G, Vassella E, Fathi AR, Murtin C, Arnold M, et al. Loss of heterozygosity 1p36 and 19q13 is a prognostic factor for overall survival in patients with diffuse WHO grade 2 gliomas treated without chemotherapy. *J Clin Oncol*. 2006;24(29):4758–63.
189. Broniscer A, Baker SJ, West AN, Fraser MM, Proko E, Kocak M, et al. Clinical and molecular characteristics of malignant transformation of low-grade glioma in children. *J Clin Oncol*. 2007;25(6):682–9.
190. Martinez R, Schackert HK, Appelt H, Plaschke J, Baretton G, Schackert G. Low-level microsatellite instability phenotype in sporadic glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2005;131(2):87–93.
191. Leung SY, Chan TL, Chung LP, Chan AS, Fan YW, Hung KN, et al. Microsatellite instability and mutation of DNA mismatch repair genes in gliomas. *Am J Pathol*. 1998;153(4):1181–8.
192. Cheng Y, Ng HK, Zhang SF, Ding M, Pang JC, Zheng J, et al. Genetic alterations in pediatric high-grade astrocytomas. *Hum Pathol*. 1999;30(11):1284–90.
193. Kanamori M, Kon H, Nobukuni T, Nomura S, Sugano K, Mashiyama S, et al. Microsatellite instability and the PTEN1 gene mutation in a subset of early onset gliomas carrying germline mutation or promoter methylation of the hMLH1 gene. *Oncogene*. 2000;19(12):1564–71.
194. Alonso M, Hamelin R, Kim M, Porwancher K, Sung T, Parhar P, et al. Microsatellite instability occurs in distinct subtypes of pediatric but not adult central nervous system tumors. *Cancer Res*. 2001;61(5):2124–8.
195. Uribe P, Wistuba II, Solar A, Balestrini C. Comparative analysis of loss of heterozygosity and microsatellite instability in adult and pediatric melanoma. *Am J Dermatopathol*. 2005;27(4):279-85.

196. Vladimirova V, Denkhaus D, Soerensen N, Wagner N, Wolff JE, Pietsch T. Low level of microsatellite instability in paediatric malignant astrocytomas. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2008;34(5):547-54.
197. Dams E, Van de Kelft EJ, Martin JJ, Verlooy J, Willems PJ. Instability of microsatellites in human gliomas. *Cancer Res.* 1995;55(7):1547-9.
198. Amariglio N, Friedman E, Mor O, Stiebel H, Phelan C, Collins P, et al. Analysis of microsatellite repeats in pediatric brain tumors. *Cancer Genet Cytogenet.* 1995;84(1):56-9.
199. Izumoto S, Arita N, Ohnishi T, Hiraga S, Taki T, Tomita N, et al. Microsatellite instability and mutated type II transforming growth factor-beta receptor gene in gliomas. *Cancer Lett.* 1997;112(2):251-6.
200. Sobrido MJ, Pereira CR, Barros F, Forteza J, Carracedo A, Lema M. Low frequency of replication errors in primary nervous system tumours. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2000;69(3):369-75.
201. Eckert A, Kloor M, Giersch A, Ahmadi R, Herold-Mende C, Hampl JA, et al. Microsatellite instability in pediatric and adult high-grade gliomas. *Brain Pathol.* 2007;17(2):146-50.
202. Szybka M, Bartkowiak J, Zakrzewski K, Polis L, Liberski P, Kordek R. Microsatellite instability and expression of DNA mismatch repair genes in malignant astrocytic tumors from adult and pediatric patients. *Clin Neuropathol.* 2003;22(4):180-6.
203. Viana-Pereira M, Lee A, Popov S, Bax DA, Al-Sarraj S, Bridges LR, et al. Microsatellite instability in pediatric high grade glioma is associated with genomic profile and differential target gene inactivation. *PLoS ONE.* 2011;6(5):e20588-8.
204. Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araújo B, Seruca R, Pimentel J, et al. Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol.* 2009;11(5):458-67.

205. Oda S, Maehara Y, Ikeda Y, Oki E, Egashira A, Okamura Y, et al. Two modes of microsatellite instability in human cancer: differential connection of defective DNA mismatch repair to dinucleotide repeat instability. *Nucleic Acids Res.* 2005;33(5):1628–36.
206. Ingham D, Diggle CP, Berry I, Bristow CA, Hayward BE, Rahman N, et al. Simple Detection of germline microsatellite instability for diagnosis of constitutional mismatch repair cancer syndrome. *Hum Mutat.* 2013;34(6):847-52.
207. Nicolaides NC, Carter KC, Shell BK, Papadopoulos N, Vogelstein B, Kinzler KW. Genomic organization of the human PMS2 gene family. *Genomics.* 1995;30(2):195–206.
208. Niessen RC, Kleibeuker JH, Jager PO, Sijmons RH, Hofstra RM. Getting rid of the PMS2 pseudogenes: mission impossible? *Hum Mutat.* 2007;28(4):414–5.
209. Clendenning M, Hampel H, LaJeunesse J, Lindblom A, Lockman J, Nilbert M, et al. Long-range PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006;27(5):490–5.
210. Hayward BE, De Vos M, Valleley EMA, Charlton RS, Taylor GR, Sheridan E, et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. *Hum Mutat.* 2007;28(5):424–30.
211. Van Der Klift HM, Tops CM, Bik EC, Boogaard MW, Borgstein AM, Hansson KB, et al. Quantification of sequence exchange events between PMS2 and PMS2CL provides a basis for improved mutation scanning of Lynch syndrome patients. *Hum Mutat.* 2010;31(5):578–87.
212. Schoenwolf GC, Bleyl SB, Brauer PR, Francis-West PH. *Larsen's Human Embryology.* 4 ed. New York: Churchill Livingstone; 2008.
213. Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, et al. The Histone Mark H3K36me3 Regulates Human DNA Mismatch Repair through Its Interaction with MutS. *Cell.* 2013;153(3):590–600.



## **8- ANEXO**





## Cômitê de Ética em Pesquisa CEP

---

Para: Danilo Vilela Viana

De: Dr. Renato José Affonso Junior  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Data: 07/01/2011

Projeto de Pesquisa: 393/2010

---

Prezado (a) Senhor (a),

Vimos, por meio desta, informar que o Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos analisou a resposta as pendências projeto de pesquisa 393/2010 “**Caracterização genético-clínica dos quadros com mutações bialélicas nos genes MMR**”, decidindo que o mesmo encontra-se:

**“Aprovado”**

*Solicitamos, que sejam encaminhados ao CEP, relatórios semestrais e final, bem como possíveis emendas e novos termos de consentimento livre e esclarecido, notifique qualquer evento adverso sério ocorrido no centro e novas informações sobre a segurança do estudo a fim de se fazer o devido acompanhamento.*

Atenciosamente,

Dr. Renato José Affonso Junior  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Hospital de Câncer de Barretos





## **9- APÊNDICES**



# TERMO DE CONSENTIMENTO

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

**Título do projeto: CARACTERIZAÇÃO GENÉTICO-CLÍNICA DOS QUADROS COM MUTAÇÕES BIALÉLICAS NOS GENES MMR**

**Investigador principal: Dr. Danilo Vilela Viana**

**OBJETIVO E JUSTIFICATIVA DA PESQUISA:** Você está sendo convidado(a) a participar de um projeto de pesquisa envolvendo pessoas que tenham tido diagnóstico de câncer na infância. O objetivo geral do estudo é procurar alterações em um grupo de genes de reparo chamados, em conjunto MMR responsáveis por um quadro clínico raro de recorrência de câncer na família e no próprio indivíduo afetado. Este estudo poderá levantar dados que permitirão um conhecimento mais aprofundado a respeito de como o câncer familiar ocorre nessa síndrome. Futuramente, também poderá contribuir para melhorar e auxiliar no tratamento das pessoas que têm essas condições. O sigilo será mantido em todo o estudo através da utilização de um número código para a identificação dos indivíduos participantes.

**PROCEDIMENTO, RISCO E DESCONFORTO:** Ao concordar em participar deste estudo, os pesquisadores poderão fazer perguntas a respeito das doenças e problemas de saúde que você e sua família já tiveram. Você também será examinado, e caso haja alterações elas poderão ser fotografadas. Em alguns casos, poderão ser colhidos 20-30ml de sangue de uma veia. Os riscos desse procedimento são mínimos, podendo ocorrer dor, manchas roxas (equimoses), e vermelhidão (inflamação) no local da coleta do sangue.

O desconforto será mínimo, pois se trata de uma coleta de sangue geralmente da veia do braço, semelhante à coleta de quaisquer outros tipos de exame de sangue comuns, e que será realizada por profissional treinado e devidamente habilitado para realizar esse procedimento. Hospitalização não é necessária.

**DURAÇÃO DO ESTUDO, ARMAZENAMENTO E USO FUTURO DA AMOSTRA COLHIDA:** A presente pesquisa (pesquisa imediata) terá uma duração de cerca de 3 anos. Após o término da pesquisa imediata, seu sangue e seu DNA poderão ser armazenadas por 5 anos, prorrogáveis, para o caso de se efetuar pesquisas complementares em outros genes que também possam estar associados ao desenvolvimento do câncer. Caso isso ocorra, será feito um novo projeto que será submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), e você será recontatado. O material armazenado não será utilizado para outras finalidades além das especificadas neste documento ou aquelas aprovadas pelo CEP.

Para que suas amostras biológicas sejam armazenadas para possíveis pesquisas no futuro, é necessária sua autorização específica para essa finalidade. Caso concorde agora e mude de ideia depois, você poderá retirar seu consentimento, bastando comunicar os pesquisadores ou o CEP. Se você não deseja que seu DNA ou derivados do seu sangue sejam armazenados para uso futuro, você pode se recusar sem que isso prejudique sua participação na pesquisa imediata (atual).

**COMUNICAÇÃO DOS RESULTADOS ENCONTRADOS:** Ao término do presente estudo você será contatado para que seja agendada uma data para serem informados os resultados encontrados, em uma sessão de aconselhamento genético.

Caso alguma alteração clinicamente significativa seja detectada, todas as consequências serão explicadas nessa ocasião. Caso você não deseje ser contatado ao término do estudo, você deve se manifestar expressamente, recusando o aconselhamento genético, preservando seu direito de não saber os resultados encontrados e seu direito de privacidade.

**BENEFÍCIOS E CUSTOS:** A participação na pesquisa não acarretará em nenhum tipo de custo. Nos casos em que a inclusão na pesquisa não seja feita na rotina do acompanhamento médico ambulatorial que você recebe no Hospital do Câncer, e desde que comunicadas previamente e aprovadas, eventuais despesas diretas pela participação no estudo poderão ser ressarcidas. Você não terá nenhuma vantagem direta com sua participação neste estudo, a não ser o conhecimento proporcionado pelos resultados dos testes a serem realizados e que serão informados somente após o término da pesquisa, na sessão de aconselhamento genético. O resultado de tais testes possui importância médica apenas para uma pequena parte da população. Caso você esteja entre as pessoas cujo exame revele algo de importante para sua saúde você receberá recomendações médicas por escrito na sessão de aconselhamento genético.

**SIGILO:** Toda informação médica, todos os dados referentes à sua família, assim como os resultados dos testes genéticos decorrentes deste projeto de pesquisa, serão submetidos aos regulamentos do Conselho Federal de Medicina, do Hospital do Câncer de Barretos referentes ao sigilo da informação médica, o que garante que seus dados não serão de livre acesso. Se os resultados ou informações fornecidas forem utilizados para fins de publicação científica, nenhum nome será utilizado.

### **RECUSA OU DESCONTINUAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO:**

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar, ou retirar seu consentimento e interromper sua participação neste estudo a qualquer momento, sem comprometer os cuidados médicos que você e/ou sua família recebem atualmente, ou receberão no futuro no Hospital do Câncer de Barretos. Existe a possibilidade, por motivos técnicos ou de força maior, de que sua participação neste estudo seja interrompida pelo Dr. Danilo Vilela Viana, desde que as razões sejam devidamente justificadas e aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa.

### **FORNECIMENTO DE INFORMAÇÃO ADICIONAL:**

Você pode requisitar informações adicionais relativas ao estudo a qualquer momento. O Dr. Danilo Vilela Viana, tel. (67) 3345-3372 estará disponível para responder suas questões e preocupações. Em caso de recurso, dúvidas ou reclamações você poderá contactar diretamente o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos:

Dr. Renato José Affonso Junior (17) 3321 6600 - ramal 6894

### **Identificação:**

**Pesquisador:** Danilo Vilela Viana

Nome do Participante: \_\_\_\_\_

Nome do Responsável: \_\_\_\_\_

Nome da Testemunha: \_\_\_\_\_

### **Responsabilidade do Pesquisador:**

Eu expliquei ao participante acima o objetivo do estudo, os procedimentos necessários e os possíveis riscos, desconfortos, benefícios e vantagens que poderão advir do estudo, usando o melhor do meu conhecimento. Eu me comprometo a fornecer uma cópia deste formulário de consentimento ao participante ou responsável.

---

Assinatura do pesquisador

### **Consentimento do participante:**

Eu confirmo que o Dr. Danilo Vilela Viana me explicou o objetivo do estudo, os procedimentos aos quais serei submetido, os riscos, desconfortos e as possíveis vantagens advindas deste projeto de pesquisa. Também me foi explicado o objetivo do armazenamento de minhas amostras biológicas, bem como a possibilidade de sua utilização futura em pesquisas que investiguem genes que predisponham ao câncer, e estou ciente que posso optar ou não em permitir esse armazenamento, sem prejudicar minha participação no presente estudo. Estou ciente, ainda, que posso escolher receber ou não receber as informações a meu respeito que esta pesquisa possa revelar. Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi todos os termos deste formulário de consentimento e estou de pleno acordo em participar do presente estudo.

**Opção sobre armazenamento de minhas amostras biológicas para uso futuro:**

- Eu concordo com o armazenamento de minhas amostras biológicas para uso futuro;
- Eu **não** concordo com o armazenamento de minhas amostras biológicas para uso futuro.

**Opção sobre Aconselhamento Genético e Comunicação dos Resultados da Pesquisa:**

- Eu desejo ser comunicado dos resultados desta pesquisa e ter aconselhamento genético;
- Eu **não** desejo ser comunicado dos resultados desta pesquisa e ter aconselhamento genético.

Eu li e/ou me foi explicado, assim como compreendi todos os termos deste formulário de consentimento, estou de pleno acordo com eles, e concordo em participar do presente estudo. Quanto às demais opções, manifesto-me expressamente conforme assinalado acima.

---

Assinatura do participante ou responsável

---

Assinatura da testemunha

Barretos/SP \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_

# FORMULÁRIO DE COLETA DE DADOS



Data da Primeira Consulta:      /      /

IDENTIFICAÇÃO	
1	Número da família
2	Número do indivíduo
3	Nome
4	RGH
5	Cadastro
6	Data de Nascimento DD-MM-AAAA
7	Data de Admissão Hospitalar DD-MM-AAAA
8	Idade atual em anos
9	Sexo 1- Feminino; 2- Masculino
10	Cor - Padrão IBGE ou exterior 1- Branco; 2- Pardo; 3- Negro; 4- Amarelo; 99- Ignorado
11	Estado Civil 0- Solteiro; 1-Casado / União estável; 2- Separado / Divorciado; 3-Viúvo; 99- Ignorado
12	Natural de
13	Nacionalidade 1- Brasil; 2- Portugal; 3- Espanha; 4- Itália; 5- Alemanha; 6- Japônês; 98- Outros _____
14	Escolaridade 1- Analfabeto; 2- 1 Grau Incompleto; 3- 1º Grau Completo; 4- 2º Grau Incompleto; 5- 2º Grau Completo; 6- Superior; 99- ignorado
15	Profissão
CÔNJUGE    OBS: PREENCHER COM 88 (NÃO SE APLICA) SE SOLTEIRO(A)	
16	Nome
17	Data de nascimento DD-MM-AAAA
18	Idade ANOS
19	Natural de
20	Escolaridade 1- Analfabeto; 2- 1 Grau Incompleto; 3- 1º Grau Completo; 4- 2º Grau Incompleto; 5- 2º Grau Completo; 6- Superior; 99- ignorado
21	Profissão
22	Cor/etnia 1- Branco; 2- Pardo; 3- Negro; 4- Amarelo; 99- Ignorado
FILIAÇÃO	
23	Nome do <b>PAI</b>
24	Data de nascimento DD-MM-AAAA
25	Idade ANOS
26	Natural de
27	Profissão
28	Nome da <b>MÃE</b>
29	Data de nascimento DD-MM-AAAA
30	Idade ANOS
31	Natural de
32	Profissão

CONTATO			
Endereço - Logradouro (Rua, Avenida)	Nº		
Bairro	Cep		
Cidade	UF		
Telefone residencial.	Cel.:		
Outros Contatos (falar com)			
Familiar que o acompanha			
e-mail:			
MOTIVO DA CONSULTA			
33	Tem diagnóstico de câncer 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado		
SE RESPOSTA FOR SIM			
34	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Múltiplos tumores primários</li> <li>2- Tumor em idade jovem</li> <li>3- Tumor bilateral</li> <li>4- Multifocalidade/sincronicidade</li> <li>5- Sítio tumoral não usual</li> <li>6- Histologia rara</li> <li>7- Tumor de mama masculino</li> <li>8- Tumor em associação com doença genética/anomalia congênita</li> <li>9- História familiar</li> <li>10- Outros</li> <li>99- Ignorado</li> </ul>		
SE RESPOSTA FOR NÃO			
35	História familiar 0- Negativa; 1- Positiva; 99- Ignorado		
36	Outros		
HISTÓRICO DA DOENÇA OBS: 88 (NÃO SE APLICA)			
37	Qual o sítio do tumor primário? (se tiver mais que um descrever o mais recente primeiro)		
38	Ano do diagnóstico		
39	Idade ao diagnóstico		
40	Descrever o anatomopatológico (Tipo, Grau, estadiamento)		
41	Já teve outro tipo de câncer, em outra parte do corpo 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado		
42	Quantos outros primários?		
43	Descrever os outros primários, sítio, ano do diagnóstico, idade ao diagnóstico, anatomopatológico, estadiamento		
HISTÓRICO DE TUMORES BENIGNOS OBS: 88 (NÃO SE APLICA)			
44	Já teve algum tipo de Tumor Benigno? 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado		
45	Qual o sítio do tumor benigno <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>1- Rim</li> <li>2- Suprarrenal</li> <li>3- Pâncreas</li> <li>4- Hipófise</li> <li>5- Osso</li> <li>6- Tireóide</li> </ul> </td> <td style="width: 50%; vertical-align: top;"> <ul style="list-style-type: none"> <li>7- Meningeoma</li> <li>8- Mioma</li> <li>9- Lipoma</li> <li>10- Cerebelo</li> <li>11- Outros _____</li> <li>99- Ignorado</li> </ul> </td> </tr> </table>	<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Rim</li> <li>2- Suprarrenal</li> <li>3- Pâncreas</li> <li>4- Hipófise</li> <li>5- Osso</li> <li>6- Tireóide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>7- Meningeoma</li> <li>8- Mioma</li> <li>9- Lipoma</li> <li>10- Cerebelo</li> <li>11- Outros _____</li> <li>99- Ignorado</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>1- Rim</li> <li>2- Suprarrenal</li> <li>3- Pâncreas</li> <li>4- Hipófise</li> <li>5- Osso</li> <li>6- Tireóide</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>7- Meningeoma</li> <li>8- Mioma</li> <li>9- Lipoma</li> <li>10- Cerebelo</li> <li>11- Outros _____</li> <li>99- Ignorado</li> </ul>		
46	Especificar quantos (por sítio)		
47	Especificar ano de ocorrência (por sítio)		

48	Especificar idade (por sítio)	
49	Já teve pólipos intestinais ou gástricos? 0- Não; 1- Sim, intestino; 2- Sim, estômago; 99- Ignorado	
50	Especificar o tipo histológico dos pólipos (por sítio)	
51	Especificar a idade do primeiro (por sítio)	
52	Especificar o ano do primeiro (por sítio)	
53	Especificar quantos pólipos intestinais 1- até 10 2- 10 a 30; 3- 30 a 100; 4- > 100	
54	Especificar quantos pólipos gástricos	
55	Lesões benignas da mama 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
56	Biópsia de mama 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
57	Especificar o tipo histológico da lesão de mama (99=Ignorado)	
58	Especificar quantas lesões benignas de mama, ano, idade,	
<b>ANTECEDENTES PESSOAIS</b>		
58	Doenças da infância 0-Não 1- Varicela; 2- Caxumba; 3- Rubéola; 4- Outras ; 99- Ignorado	
59	Pele 0-Não 1- Manchas; 2- Verrugas; 3- Nódulos; 4- Outras ; 99- Ignorado	
60	Olhos 0-Não 1- Refração; 2- Glaucoma; 3- Catarata (especificar lateralidade e localização); 4-Hipertrofia congénita do epitélio da retina; 5- Outras alterações da retina; 6- Luxação de cristalino; 7- Nódulos de Lisch; 8- Outras ; 99- Ignorado	
61	Ouvidos e Sistema Vestibular 0-Não 1- Hipoacusia; 2- Acúfenos; 3- Tontura; 4- Vertigem; 5- Outros ; 99- Ignorado	
62	Sistema cardiovascular 0-Não 1- Sopros; 2- Anomalias valvares; 3- Dilatações de aorta; 4- HAS; 5- Coronariopatia; 6- Dislipidemia; 7- Outros ; 99- Ignorado	
63	Sistema respiratório 0-Não 1- Pneumonias de repetição; 2- Asma brônquica; 3- Enfisema; 4- Outras ; 99- Ignorado	
64	Sistema gastrointestinal 0-Não; 1- Gastrite; 2- H pylori positivo; 3- Úlcera péptica; 4- Alternância de hábito intestinal; 5- Doença inflamatória intestinal não especificada; 6- Retocolite ulcerativa; 7- Doença de Crohn ; 8- Outros ; 99- Ignorado	
65	Sistema genitourinário 0-Não 1- Criptorquia; 2- Hipospádia; 3- ITU de repetição; 4- Prostatite; 5- Uretrite; 6- Hiperplasia prostática 7-Outros 99-Ignorado	
66	Sistema Endócrino 0- Não; 1- Doenças da tireóide( especificar); 2- Doenças das paratireóides(especificar); 3- Doenças da hipófise; 4- Hipogonadismo; 5- Hipergonadismo; 6- Diabetes Melitus;; 7- Outros ; 99- Ignorado	
67	Sistema Nervoso 0-Não 1- Cefaleia; 2- Convulsão; 3- Epilepsia; 4- Neuropatia; 5- Outros ; 99- Ignorado	
68	Afeções Psiquiátricas 0-Não 1- Depressão; 2- Transtorno bipolar; 3- Ansiedade; 4- Esquizofrenia; 5- Outros ; 99- Ignorado	
69	Doenças Reumáticas, do colágeno, auto-imune (Especificar) 0-Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
70	Doenças Hematológicas, discrasias (Especificar) 0- Não; 1- Sim; 99- Ignorado	
71	Doenças infecto-parasitárias 0- Não; 1- Malária; 2- Doença de Chagas; 3- SIDA; 4- Hepatite; 5- Tuberculose; 6- Outros ; 99- Ignorado	
72	Cirurgias (Especificar as cirurgias, inclusive para câncer) 0-Não; 1- Sim; 99- Ignorado	

73	Medicações em Uso (Especificar)	0-Não; 1- Sim; 99- Ignorado				
73	Rastreamento para câncer 0- Não; 1- Colo uterino; 2- EDA; 3- Colonoscopia; 4- Mamografia; 5- Outros _____; 99- Ignorado					
<b>HISTÓRIA FAMILIAL</b>						
74	Antecedentes Familiares 0- Não; 1- Câncer; 2- Anomalias congênitas; 3- Deficiência mental; 4- Abortamentos recorrentes; 99- Ignorado					
75	ASCENDÊNCIA (país de nascimento, estado, cidade) Avô Paterno					
76	Avó Paterna					
77	Avô Materno					
78	Avó Materna					
79	Outras ascendências paternas (bisavós)					
80	Outras ascendências maternas (bisavós)					
81	Consangüinidade	0- Não; 1- Sim				
82	Tipo de consangüinidade 0-Não 1- Entre os pais; 2- Entre os avós; 3- Outros	99- Ignorado				
83	Alguém da família já realizou teste genético	0- Não; 1- Sim				
84	Se Sim, qual teste? Se não 88 (não se aplica)					
<b>IRMANDADE</b>						
n°	Nome	Sexo	Idade	Câncer	Examinado?	Obs.
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						
9						
10						
11						
12						
13						
<b>PROLE</b>						
n°	Nome	Sexo	Idade	Câncer	Examinado?	Obs.
1						
2						
3						
4						
5						
6						
7						
8						





# THE MICROSATELLITE INSTABILITY IN A RETROSPECTIVE SERIES OF CNS TUMORS

<sup>1,2,3</sup>Viana DV; <sup>4</sup>Viana-Pereira M; <sup>5</sup>Almeida G; <sup>6</sup>Clara C; <sup>2,7</sup>Palmero E;  
<sup>5</sup>Scapulatempo Neto C; <sup>8</sup>Jones C; <sup>1</sup>Bertuzzo CS; <sup>7</sup>Reis RM.

Institution:

<sup>1</sup>Department of Medical Genetics - FCM, University of Campinas (Unicamp), BRAZIL;

<sup>2</sup>Department of Oncogenetics - Barretos Cancer Hospital, BRAZIL.

<sup>3</sup>School of Medicine - Federal University of South Mato Grosso(UFMS), BRAZIL;

<sup>4</sup>Life and Health Sciences Research Institute(ICVS) - School of Health Sciences - University of Minho, PORTUGAL

<sup>5</sup>Department of Pathology - Barretos Cancer Hospital, BRAZIL;

<sup>6</sup>Department of Neurosurgery - Barretos Cancer Hospital, BRAZIL;

<sup>7</sup>Molecular Oncology Research Center - Barretos Cancer Hospital, BRAZIL;

<sup>8</sup>Institute of Cancer Research, Sutton, UK.

\*Department of Genetics, Faculty of Medical Sciences, University of Campinas, 13081-970, P.O. Box: 6111, Campinas, SP, Brazil.

**Running Title:** the microsatellite instability and CNS tumors

**Keywords:** Microsatellite instability, CNS tumors, MMR genes, C-MMRD, CoLoN

## Abstract

In Lynch syndrome (LS), Cancer predisposition is due almost exclusively to heterozygous germline mutations in one of the DNA MMR genes. Childhood cancers and hematological neoplasia generally do not belong to the syndrome spectrum. Childhood cancers and hematological neoplasia generally do not belong to the Lynch tumour spectrum. However, over the past few years there have been reports of children that have presented with the constellation of early onset gastrointestinal cancers, along with features of neurofibromatosis type-1 and/or hematologic malignancies, and/or neurological tumors due to homozygous mutations in the mismatch repair genes. This clinical condition has been called with varying names, such as “CoLoN” (for Colon tumors or/and Leukemia/Lymphoma or/and Neurofibromatosis features), MMR deficiency syndrome, and more recently, Constitutional MMR-Deficiency (C-MMRD). The aim of our study was to analyze the frequency of microsatellite instability in tumors; the frequency of germline mutations in MMR genes in patients who had MSI, and its correlation to C-MMRD phenotype in a retrospective series of childhood and young adults with CNS tumors. Tumor samples from patients diagnosed with gliomas or medulloblastomas, from 0 to 35 years, between 2000 and 2011 were obtained from tissue bank, and analyzed for microsatellite instability. A total of 42 gliomas and 37 medulloblastomas were analyzed. The MSI evaluation was performed using a multiplex PCR comprising five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers (NR27, NR21, NR24, BAT25 and BAT26). Mutation analysis of all coding exons of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* was performed by sequencing. In the whole group, 15 patients that had an unstable tumor (TABLE 1). We found 7 (17.5%) gliomas and 8 (22.2%) medulloblastomas to be unstable, all of them had low instability. We did not find cases of biallelic mutations in *MLH1*, *MSH2* or *MSH6* in a series of children and young adults with CNS tumors.

## Introduction

Lynch syndrome (LS) is an autosomal dominant hereditary cancer predisposition disorder characterized by early onset of cancer (mean age, approximately 40-45 years), especially endometrium and/or colorectal cancer in the absence of gastrointestinal polyposis, and which, in addition, shows increased frequency of carcinomas of the ovary, small intestine, ureter, renal pelvis, stomach, among others. Its molecular hallmark is one type of genetic instability known as microsatellite instability (MSI), that affects short sequences of DNA repeats (microsatellites) found throughout the genome, leading to accumulation of genetic alterations.

In LS, Cancer predisposition is due almost exclusively to heterozygous germline mutations in one of the DNA MMR genes (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, and *hMSH6*), although recently it has been demonstrated germline epimutations causing this diagnosis. Nevertheless, mutations in *hMSH2* and *hMLH1* account for the vast majority of the cases. The presence of a wild-type allele of these genes appears to be sufficient for normal MMR activity, while cancer in predisposed individuals results from the occurrence of a somatic alteration of this normal copy, leading to a disruption in this DNA repair system and to the MSI phenotype.

Childhood cancers and hematological neoplasia generally do not belong to the Lynch tumour spectrum. However, over the past few years there have been reports of children that have presented with the constellation of early onset gastrointestinal cancers, along with features of neurofibromatosis type-1 and/or hematologic malignancies, and/or neurological tumors due to homozygous mutations in the mismatch repair genes. This clinical condition has been called with varying names, such as “CoLoN” (for Colon tumors or/and Leukemia/Lymphoma or/and Neurofibromatosis features), MMR deficiency syndrome, and more recently, Constitutional MMR-Deficiency (C-MMRD).

The recognition of this phenotype has importance on screening recommendations and genetic counselling for families.

## **Aim**

The aim of our study was to analyze the frequency of microsatellite instability in tumors; the frequency of germline mutations in MMR genes in patients who had MSI, and its correlation to C-MMRD phenotype in a retrospective series of childhood and young adults with CNS tumors.

## **Methods**

Tumor samples from patients diagnosed with gliomas or medulloblastomas, from 0 to 35 years, between 2000 and 2011 were obtained from tissue bank, and analyzed for microsatellite instability. A total of 42 gliomas and 37 medulloblastomas were analyzed. Among the gliomas, 30 were male (71.4%), and 12 female (28.6%), mean age was 21.5 years (range, 3-35 years). From the medulloblastomas group, 21 were male(56.8%), 16 female(43.2%), mean age 13.6 years (range 2-35 years).

## **DNA extraction of tumor samples**

DNA was extracted from 10- $\mu$ m-thick formalin- fixed, paraffin-embedded tumor samples as previously described(Gomes et al 2008). Briefly, tissues were deparaffinized by a serial extraction with xylene and ethanol (100%/70%/50%), and separately selected areas of tumor and normal tissue, when available, were microdissected using a sterile needle and carefully collected into a 0.2-mL PCR tube. DNA was extracted using QIAamp DNA Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany), following the manufacturer's instructions.

The MSI evaluation was performed using a multiplex PCR comprising five quasimonomorphic mononucleotide repeat markers (NR27, NR21, NR24, BAT25 and BAT26) (Viana-Pereira, 2009). Primer sequences were described previously (Buhard 2004).

Each antisense primer was end-labeled with 6-carboxy-fluorescein (FAM), hexachloro-6-carboxyfluorescein (HEX), or tetrachloro-6-carboxyfluorescein (TET) fluorescent marker. PCR was performed using Qiagen Multiplex PCR Kit, and the products were separated using an ABI capillary genetic analyzer. The MSI Status of the tumor was analyzed using GeneScan analysis software (version 3.7; Applied Biosystems).

Cases exhibiting instability at two or more markers were considered to have high MSI (MSI-H), those with instability at one marker were considered to have low MSI (MSI-L), and those showing no instability were defined as microsatellite stable (MSS) (Wong 2006). DNA from cell lines HCT15(MSI) and DAOY(MSS) were used as controls. The quasimonomorphic variation range (QMVR) of each marker, previously described (Buhard, 2006).

Those patients that had an unstable tumor (MSI-H or MSI-L) were invited for clinical evaluation, including family history taking and physical examination. Subsequently, those that agreed had blood samples drawn for sequence analysis of the MMR genes.

### **Genomic DNA extraction**

DNA was extracted from peripheral blood using QIAamp DNA Micro Kit, following the manufacturer's instructions.

## Sequence Analysis

Patient Nº	Tumor	Results					
		<i>status</i>	NR21	BAT26	NR27	BAT25	NR24
			105-1077	179-181	86-88	147-149	122-124
Patient G6	Anaplastic Oligodendroglioma WHO grade III	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
Patient G8	Pilocytic Astrocytoma WHO grade I	MSI-L	<b>102-107</b>	181	87	147	124
Patient G10	Glioblastoma	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122
Patient G21	Oligodendroglioma WHO grade II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	147	122
Patient G22	Oligodendroglioma WHO grade II	MSI-L	107	<b>178</b>	88	149	123
Patient G23	Oligodendroglioma WHO grade II	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	123
Patient G41	Pilocytic Astrocytoma WHO grade I	MSI-L	107	180	87	<b>148-150</b>	123
Patient M7	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	107	<b>177-180</b>	87	<b>146</b>	123
Patient M12	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	106	<b>165-180</b>	86	147	123
Patient M14	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	105	180	86	<b>144-147</b>	123
Patient M15	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	<b>103-106</b>	180	86	147	122
Patient M21	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	106	180	87	147	<b>123-132</b>
Patient M29	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	106	180	<b>84</b>	147	122
Patient M35	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	105	<b>173-179</b>	87	147	123
Patient M36	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	106	180	<b>84-87</b>	148	123

Mutation analysis of all coding exons of *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* was performed by PCR, using primers previously described (Hegde 2005), followed by direct sequencing.

This study had IRB approval, and written consent form was obtained from patients.

## Results

In the whole group, 15 patients that had an unstable tumor (Table 1). We found 7 (17.5%) gliomas and 8 (22.2%) medulloblastomas to be unstable, all of them had low instability.

We further sought to correlate this finding with the phenotype and sequence analysis of the MMR genes, and tried to contact these fifteen patients for participation in our study. Eight patients had died. From the remaining, six were examined. One refused participation. We report these six patients findings.

### Table 1- MSI Status

**Table 2-** MSI Status in examined patients

			Results					
			NR21	BAT26	NR27	BAT25	NR24	
			<i>MSI status</i>	105-1077	179-181	86-88	147-149	122-124
	Anaplastic							
Patient G6	Oligodendroglioma WHO grade 3	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	122	
Patient G8	Pilocytic Astrocytoma WHO grade 1	MSI-L	<b>102-107</b>	181	87	147	124	
Patient G22	Oligodendroglioma WHO grade 2	MSI-L	107	178	88	149	123	
Patient G23	Oligodendroglioma WHO grade 2	MSI-L	<b>108</b>	180	87	148	123	
Patient M12	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	106	180	84-87	148	123	
Patient M36	Medulloblastoma WHO grade IV	MSI-L	<b>104-106</b>	180	87	147	123	

**Patient G6**

Female, diagnosed at age 5 with **anaplastic oligodendroglioma (WHO grade 3)**.

**Family History(FH):** she is the second child of a non-consanguineous couple. Her paternal grandfather died of colorectal cancer at age 60. Also on her paternal family, a first-degree cousin had his eye enucleated at age 5 (diagnosis not confirmed).

**Physical Examination(PE):** revealed **3 large cafe-au-lait macules >1cm (on the side of her face, on her neck, on her abdomen), and a large pigmented nevus.**

**Sequence Analysis:** no pathogenic mutations were found

### **Patient G8**

Male, diagnosed at age 11 with **pilocytic astrocytoma (WHO grade 1)**.

**FH:** was unremarkable for cancer, but curiously, he had recurrence of neurologic diseases. He has one brother (age 21) who has been diagnosed with dyslexia, and a sister (age 17) that has a history of stroke-like symptoms at age 6 (she had a history of headaches, and sudden development of left hemiparesia, which almost completely resolved after 15 days - diagnosis not confirmed). His uncle (his mother's brother) died at age 19 with a history of normal development until 5 years of age, when it is referred the beginning of a typical neurologic involution.

**PE:** ephelides on the face, **4 cafe-au-lait macules >0,5cm (on his arms, 1 on his abdomen, 1 on his thigh), hypopigmented macules, and pigmented nevi.**

**Sequence Analysis:** no pathogenic mutations were found

### **Patient G22**

Male, diagnosed at age 25 with **oligodendroglioma (WHO grade 2)**. He had a history of dark brown spots on the palms on his hands that faded during adolescence. He had no signs of hamartomatosis or Peutz-Jeghers Syndrome.

**FH:** he was the first child of a non-consanguineous couple. Her mother had two spontaneous abortions. On his paternal side: His grandfather had prostate cancer at age 72. A first-degree cousin had hydrocephaly diagnosed at age 5 (currently is 30). A second-degree cousin died as a baby with multiple congenital anomalies (no diagnosis). On his maternal side: his grandfather died of esophageal cancer at age 65. A female first-cousin has a history of stroke at age 18.

**PE:** unremarkable.

**Sequence Analysis:** no pathogenic mutations were found

### **Patient G23**

Male, diagnosed at age 28 with **oligodendroglioma (WHO grade 2)**.

**FH:** unremarkable for cancer. He is the first child of a non-consanguineous couple. His younger sister has uncontrollable seizures that began at age 12 (she is now 18).

**PE:** unremarkable.

**Sequence Analysis:** no pathogenic mutations were found

### **Patient M12**

Female, diagnosed at age 09 with **medulloblastoma (WHO grade IV)**.

**FH:** her mother has just been diagnosed with breast cancer at age 44. No other history of cancer in her family.

**PE:** unremarkable.

**Sequence Analysis:** no pathogenic mutations were found

### **Patient M36**

Male, diagnosed at age 16 with **medulloblastoma (WHO grade IV)**. He was born premature (7 months) and during his neonatal period had 3 cardiorespiratory reanimations. He had a normal development.

**FH:** unremarkable for cancer. He is the second child of a non-consanguineous couple. His parents lost their first child with a few days of life because of a intestinal malformation (diagnosis not confirmed).

**PE:** unremarkable.

**Sequence Analysis:** no patogenic mutations were found

## Discussion

Our study tried to identify patients with bialelic mutations in MMR genes screening glioma and medulloblastoma for MSI in a retrospective series of children and young adults patients.

Tumorigenesis of gliomas in children seems different from adults. Cytogenetic anomalies and mutations in *TP53* gene are frequent in adults, but seldom occurs in children with these tumors. The converse occurs with MSI, which is more common in children. In literaturre, MSI frequency in gliomas vary from 0-44%, in different studies, possibly reflecting different methods of screening dor MSI. In a study which included brazilian patients, Viana-Pereira compared the MSI frequency in a group of young patients (0-23 years) with adult patients (>32 years) and showed a frequency 19.7% in the first and 6.8% in this last group. Although our series is different, as we included patients only until 35, stratifying patients in a group from 0-23 we found MSI in 16.7% of these patients, and surprisingly, in 18,2% in the group from 24-35, showing that maybe gliomas in young adults are more similar to gliomas in children.

We also studied MSI in medulloblastomas and found in 8.3% of patients. These tumors are less studied, but this number is lower than previously reported by our group in a different study, in which we tried to identify possible target-genes.

In this study we had as our goal to identify possible germline biallelic mutations in MMR genes. In a similar study, Giunti analyzed 34 cases of glioma for MSI and found two cases of biallelic mutations (5%). Given the recurrence risk of

this phenotype, we thought it was important to confirm this high frequency among children with gliomas, and additionally with medulloblastomas.

Our study was somewhat different as we examined the patients before proceeding to sequence analysis. We did not find any pathogenic mutations in *MLH1*, *MSH2* or *MSH6*.

An important limitation in our study was that we did not screen for mutations in *PMS2*. Analysis of this gene is tricky, and it seems, screening using RNA would be the best approach, something we could not perform.

## **Conclusion**

We did not find cases of biallelic mutations in *MSH1*, *MSH2* or *MSH6* in a series of children and young adults with CNS tumors. Further studies are necessary to address the question of the frequency of this phenotype among these patients, an important question for genetic counseling, and possibly for indicating MSI screening in this population.

## References

Buhard O, Cattaneo F, Wong YF, Yim SF, Friedman E, et al. Multipopulation analysis of polymorphisms in five mononucleotide repeats used to determine the microsatellite instability status of human tumors. *J Clin Oncol*. 2006;24:241–251.

Buhard O, Suraweera N, Lectard A, Duval A, Hamelin R. Quasimono-morphic mononucleotide repeats for high-level microsatellite instability analysis. *Dis Markers*. 2004;20:251–257.

Gomes AL, Gouveia A, Capelinha AF, et al. Molecular alterations of KIt and PDGFRA in GISTs: evaluation of a Portuguese series. *J Clin Pathol*. 2008; 61:203–208.

Hegde M, Blazo M, Chong B, Prior T, Richards C. Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *J Mol Diagn*. 2005;7:525–534.

Viana-Pereira M, Almeida I, Sousa S, Mahler-Araujo B, Seruca R, et al. Analysis of microsatellite instability in medulloblastoma. *Neuro Oncol*. 2009;11:458–467.

Wong YF, Cheung tH, Lo KW, et al. Detection of microsatellite instability in endometrial cancer: advantages of a panel of five mononucleotide repeats over the National Cancer Institute panel of markers. *Carcinogenesis*. 2006;27:951–955.