Isabella Nicácio de Freitas

**Caracterização imuno-histoquímica e
molecular dos pacientes com suspeita
clínica de Síndrome de Lynch**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Doutor em Ciências

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. Ulysses Ribeiro Júnior

São Paulo

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Freitas, Isabella Nicácio de

Caracterização imuno-histoquímica e molecular dos pacientes com suspeita
clínica de Síndrome de Lynch / Isabella Nicácio de Freitas. -- São Paulo, 2014.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Ciências em Gastroenterologia.

Orientador: Ulysses Ribeiro Júnior.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Neoplasias colorretais hereditárias
sem polipose 3.Instabilidade de microssatélites 4.Imuno-histoquímica 5.Proteínas
proto-oncogênicas B-raf 6.Guias de prática clínica com assunto

USP/FM/DBD-332/14

Dedicatória

Dedico esta tese a meus amados pais, Raimundo Euvaldo (in memorian) e Dijanete (in memorian), que me inspiraram na ampliação dos meus conhecimentos sobre esta síndrome e pelo exemplo de força, caráter, honestidade e amor.

A minhas irmãs queridas, Filomena e Maria do Socorro pelo apoio, companheirismo e entusiasmo.

Agradecimentos

Primeiramente a Deus pela presença constante em minha vida.

Ao meu prezado orientador, Prof. Ulysses Ribeiro Júnior, que apoiou e abraçou esta minha luta, proporcionando oportunidades únicas de crescimento profissional, autoestima e aprendizado acadêmico.

Ao Prof. Venâncio Avancini Ferreira Alves pelo companheirismo e pela preciosa contribuição nas análises histopatológicas e imuno-histoquímicas. Sem seu apoio, não teria conseguido. Muito obrigada por tudo.

Aos Professores Ivan Cecconello e Luiz Augusto Carneiro D'Albuquerque pelo carinho, amizade, estímulo e grande ajuda na concretização desta jornada.

Aos demais Profs. do Departamento de Gastroenterologia que muito me ensinaram ao longo do tempo em que estive aqui. Em particular, agradeço aos queridos Prof. Aytan Miranda Sipahi e Prof. Aderson O. M. C. Damião pelo carinho e dedicação nos ensinamentos ao longo da minha formação como gastroenterologista.

Ao Prof. Dr. Raul Cutait incentivador desde a minha chegada a São Paulo e a sua amizade ao longo de toda minha carreira profissional.

Ao Dr. Luiz Câmara Lopes e a Dra. Kátia Leite, pela receptividade e primeiros ensinamentos na área de Biologia Molecular.

Ao Prof. Bruno Zilberstein pela leitura do manuscrito, incentivo e apoio na realização desta tese.

À Dra. Alina Quitanilha e Dr. Afonso Henrique da Silva e Souza Júnior pelo apoio, carinho e correções valiosas.

Aos Profs. participantes da banca de qualificação: Dra. Renata de Almeida Coudry, Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira e Dr. Afonso Henrique da Silva e Souza Júnior pela leitura cuidadosa, críticas construtivas e pelas importantes e enriquecedoras sugestões.

Aos queridos Dra. Juliana Magalhães, Dr. George Câmara Lopes, Dra. Clarissa Maria Oliveira pela ajuda nas revisões e padronizações das lâminas, realização do BRAF e convívio diário. Meus sinceros agradecimentos.

À Dra. Renata Moutinho pelo companheirismo e orientações na aula de qualificação.

À D. Alda Wakamatsu pelo apoio na confecção das lâminas e realização dos ensaios imuno-histoquímicos.

À bióloga Ligia Petrolini de Oliveira e Dra. Renata de Almeida Coudry pela realização e leitura dos ensaios de instabilidade dos microssatélites.

Ao Dr. Márcio Augusto Diniz pela brilhante colaboração nas análises estatísticas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa. (FAPESP Projeto Regular Nº 2010/06045-8).

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

Sumário

Lista de Abreviaturas

Lista de Quadros

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO.....	1
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	4
2.1	Epidemiologia do câncer colorretal.....	5
2.1.1	Epidemiologia no Brasil	7
2.2	Síndrome de Lynch (SL).....	9
2.2.1	Histórico	9
2.2.2	Terminologia	11
2.2.3	Carcinogênese.....	13
2.2.4	Características clínicas	16
2.2.5	Modelos de Predição Genéticos	20
2.2.6	Histopatologia	23
2.2.7	Imuno-histoquímica.....	24
2.2.8	Instabilidade de microsatélites	26
2.2.9	BRAF	27
3	OBJETIVOS.....	29
4	MÉTODOS.....	31
4.1	Casuística e amostras	32
4.2	Critérios de inclusão	33
4.3	Critérios de exclusão	33
4.4	Variáveis anatomopatológicas.....	34
4.5	Ensaio imuno-histoquímico	35
4.5.1	Anticorpos primários utilizados e padronização dos ensaios	35
4.5.2	Controles positivos e negativos usados durante os ensaios imuno-histoquímicos.....	39
4.5.3	Interpretação dos resultados das reações imuno-histoquímicas	39

4.6	Instabilidade de Microssatélites (MSI)	40
4.6.1	Sistema de Análise MSI	40
4.6.2	Protocolo de extração	41
4.6.3	Amplificação.....	43
4.6.4	Perfil da ciclagem.....	43
4.6.5	Preparação da amostra	44
4.7	Análise da mutação somática para o BRAF	45
4.7.1	Técnica	45
4.7.2	Interpretação.....	45
4.8	Análise Estatística	46
5	RESULTADOS	48
5.1	CrITÉRIOS de Amsterdam I e Bethesda Revisados	49
5.2	Localização do tumor	50
5.3	Histopatologia.....	50
5.4	Imuno-histoquímica	53
5.5	Instabilidade de Microssatélites.....	56
5.6	Análise da mutação somática para BRAF	57
5.7	Associações entre as variáveis estudadas	58
5.7.1	IHC.....	58
5.7.2	MSI	63
5.8	CrITÉRIOS de Amsterdam.....	66
5.9	Testes de associação, Regressão binária simples e Regressão binária múltipla	67
5.10	Escore	71
6	DISCUSSÃO.....	74
6.1	CrITÉRIOS de Amsterdam I e Bethesda Revisados	75
6.2	Localização do Tumor	79
6.3	Histopatologia.....	80
6.4	Imuno-histoquímica	82
6.5	Instabilidade de Microssatélites.....	83
6.6	Perspectivas	85
7	CONCLUSÕES.....	88
8	ANEXOS.....	90
9	REFERÊNCIAS	105

Lista de Abreviaturas

CCR	câncer colorretal
CIMP	Fenótipo metilador de ilhotas CpG
CIN	instabilidade cromossômica (chromosomal instability)
D.P.	desvio padrão
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FCCTX	câncer colorretal familiar tipo X
H₂O₂	peróxido de hidrogênio
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
hMLH1	gene codificador para a proteína MLH1
hMSH2	gene codificador para a proteína MSH2
hMSH6	gene codificador para a proteína MSH6
HNPCC	Síndrome do câncer colorretal hereditário não polipoide
hPMS2	gene codificador para a proteína PMS2
IHC	imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LIM-14	Laboratório de Investigação Médica 14
LOH	perda de heterozigosidade (loss of heterozygosity)
M:F	Proporção Masculino:Feminino
MLH1	proteína MLH1
MMR	correção de erros de pareamento (mismatch repair)
MSH2	proteína MSH2
MSH6	proteína MSH6

MSI	instabilidade de microssatélites (microsatellite instability)
MSI-H	fenótipo microssatélite instável de alta frequência
MSI-L	fenótipo microssatélite instável de baixa frequência
MSS	fenótipo microssatélite estável
NCI	Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos (National Cancer Institute)
PBS	solução salina tamponada com fosfatos
PCR	reação de cadeia da polymerase (polymerase chain reaction)
PH	pólipos hiperplásicos
PS	pólipos serrilhados
PMS2	proteína PMS2
RA	recuperação antigênica
RER	fenótipo portador de erros de replicação (replicação erro)
SL	Síndrome de Lynch
SPS	Síndromes de poliposes serrilhadas
USP	Universidade de São Paulo
VM	via mutadora
VS	via supressora

Lista de Quadros

Quadro 1. Distribuição dos Anticorpos utilizados nas reações de IHC, técnicas de recuperação antigênica, titulação e método de revelação das reações	36
Quadro 2. Pesquisa da MSI	40
Quadro 3. Avaliação dos critérios clínicos quanto à associação com as variáveis clínico-patológica em 61 pacientes	68
Quadro 4. Escore para IHC.....	72
Quadro 5. Escore para MSI.....	73

Lista de Figuras

Figura 1.	Representação da análise da mutação V600E (1799 T>A) do gene BRAF. No eletroferograma do sequenciamento está destacado um exemplo de selvagem (A) e de mutação em heterozigose (B).	46
Figura 2.	Carcinoma pouco diferenciado apresentando padrão medular. Padrão expansivo de crescimento (HEX100).....	51
Figura 3.	Carcinoma sólido pouco diferenciado padrão medular (HEX400) .	52
Figura 4.	Carcinoma sólido pouco diferenciado apresentando padrão medular (HEX100).....	52
Figura 5.	Folículo linfoide com exuberante centro germinativo (HEX100)....	53
Figura 6.	MLH1 alterado na neoplasia. Diversos linfócitos reativos servem como controle positivo (Imuno-histoquímicaX200).....	54
Figura 7.	MLH1 alterado na neoplasia. Diversos linfócitos reativos servem como controle positivo (ImunoperoxidaseX400).....	54
Figura 8.	PMS2 positivo. Negativo para células neoplásicas. Diversos linfócitos com núcleos reativos servem como controle positivo (X100)	55
Figura 9.	MSH2 positivo nos núcleos das células neoplásicas e nas células do estroma (X200).....	55
Figura 10.	MSH6 positivo nas células neoplásicas e nas células do estroma (X100)	56
Figura 11.	Curva ROC para IHC	71
Figura 12.	Curva ROC para MSI	72

Lista de Tabelas

Tabela 1.	Frequência dos critérios clínicos para a Síndrome de Lynch	49
Tabela 2.	Localização dos tumores.....	50
Tabela 3.	Histopatologia positiva e negativa	50
Tabela 4.	Componentes histopatológicos avaliados em 61 pacientes com história familiar e pelo menos um critério de Bethesda revisado ...	51
Tabela 5.	Resultado da avaliação Imuno-histoquímica em 61 pacientes com história familiar e pelo menos um critério de Bethesda revisado.....	53
Tabela 6.	MSI positiva e negativa	56
Tabela 7.	Distribuição dos resultados da IHC, MSI e BRAF nos 12 pacientes alterados	57
Tabela 8.	Histopatologia negativa e localização do tumor	58
Tabela 9.	Associação entre a IHC e a localização dos tumores colorretais ..	59
Tabela 10.	Critérios de Bethesda revisados e imuno-histoquímica alterada...	59
Tabela 11.	Dímeros positivos e Critérios de Bethesda revisados	60
Tabela 12.	Critérios histopatológicos na imuno-histoquímica alterada	61
Tabela 13.	Critérios histopatológicos na imuno-histoquímica não alterada	62
Tabela 14.	Distribuição dos 61 pacientes de acordo com os achados imuno-histoquímicos e as variáveis clínico-patológicas.	63
Tabela 15.	MSI positivo e critérios de Bethesda revisados	64
Tabela 16.	MSI positivo e histopatologia.....	65
Tabela 17.	Distribuição dos 61 pacientes de acordo com os achados de MSI (confirmados pela análise do BRAF) e as variáveis clínico-patológicas.	65

Tabela 18. Amsterdam I positivo, histopatologia positiva e negativa, imuno-histoquímica alterada e não alterada e MSI positiva e negativa	66
Tabela 19. Regressão Binária Simples (MSI)	69
Tabela 20. Regressão Binária Simples (IHC).....	70
Tabela 21. Regressão Logística Binária Múltipla (MSI).....	70

RESUMO

Freitas IN. *Caracterização imuno-histoquímica e molecular dos pacientes com suspeita clínica de Síndrome de Lynch* [tese]. São Paulo – Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo; 2014. 126p.

Suspeita-se da Síndrome de Lynch (SL) a partir da história pessoal e familiar do indivíduo. Posteriormente, os dados histopatológicos, imuno-histoquímicos e moleculares podem ser utilizados para aprimorar o diagnóstico da doença. Entretanto, um grande desafio no diagnóstico da Síndrome de Lynch é a baixa acurácia dos critérios clínicos utilizados. **OBJETIVOS:** Avaliar a frequência de SL em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico por câncer colorretal e com história familiar de câncer. Avaliar quais dos critérios clínicos e/ou moleculares seriam mais informativos no diagnóstico desta Síndrome na população brasileira.

PACIENTES E MÉTODOS: Estudaram-se 458 casos de câncer colorretal (CCR), do Serviço de Coloproctologia do Departamento de Gastroenterologia do Hospital das Clínicas – FMUSP, de janeiro de 2005 a dezembro de 2008. História familiar (HF) positiva para CCR ocorreu em 118 pacientes. Promoveu-se a revisão das lâminas para critérios histopatológicos de MSI (diretrizes de Bethesda), avaliação imuno-histoquímica (IHC) para as proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, através do complexo avidina-biotina-peroxidase e instabilidade de microssatélites (MSI) (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27). Realizada a análise da mutação somática para o BRAF em todos os casos com MSI positiva.

RESULTADOS: Dos 118 pacientes com HF, 61 (51,69%) preencheram pelo menos um dos critérios de Bethesda revisados. 36 eram do sexo feminino (59%), média de idade de 53,2 anos. Nove (14,7%) pacientes apresentaram todos os critérios de Amsterdam I. Cinquenta e dois tumores localizaram-se no cólon esquerdo. Os componentes histopatológicos de MSI incluíram: linfócitos intratumoral (47,5%), característica expansiva do tumor (29,5%) e o componente mucinoso (27,8%) (componentes histopatológicos de MSI instável) em 44 (72%). A IHC estava alterada em oito (13%) e a MSI em 12 pacientes (20%). Houve associação entre os critérios de Amsterdam I e MSI e na IHC com MLH1 e PMS2. Houve associação entre os critérios de Bethesda revisados com o sexo, na histopatologia com o componente mucinoso e a reação Crohn like; com a MSI e na IHC com o MLH1 e PMS2. O BRAF foi realizado nos 12 casos com MSI positiva e em todos os casos foram negativos. Os indivíduos que apresentaram o critério 4 de Bethesda revisado (CCR ou câncer associado a SL, diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau, desde que uma das neoplasias tenha ocorrido antes dos 50 anos de idade), tiveram uma chance 10,6 vezes maior de apresentar MSI positiva. Propôs-se um escore para caracterizar pacientes com SL baseado nas variáveis estudadas nesta pesquisa. **CONCLUSÕES:** A frequência de Síndrome de Lynch nos pacientes submetidos a ressecção por

câncer e com história familiar foi de 20%. O critério 4 de Bethesda revisado associou-se mais fortemente à presença de instabilidade de microssatélites na população estudada. O escore desenvolvido neste estudo contribui como uma ferramenta prática na ampliação diagnóstica da Síndrome de Lynch.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais 2.Neoplasias colorretais hereditárias sem polipose 3.Instabilidade de microssatélites 4.Imuno-histoquímica 5.Proteínas proto-oncogênicas B-raf 6.Guias de prática clínica como assunto

SUMMARY

Freitas IN. *Immunohistochemical and molecular characterization of patients with clinical suspicion of Lynch Syndrome* [thesis]. São Paulo – “Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo”; 2014. 126p.

Lynch Syndrome is suspected due to the personal and familial history of the individual. Subsequently, histopathological, immunohistochemical and molecular data can be used to improve diagnosis of the disease. However, a major challenge in the diagnosis of Lynch Syndrome is the low accuracy of clinical criteria. **OBJECTIVES:** To assess the frequency of Lynch Syndrome in patients with familial cancer history submitted to colorectal cancer resection. To assess what clinical and / or molecular criteria would be the most informative in the diagnosis of this syndrome in Brazilian population. **PATIENTS AND METHODS:** 458 colorectal cancer (CRC) cases were studied, from the Coloproctology Unit of the Department of Gastroenterology, Hospital das Clinicas - USP, from January 2005 to December 2008. Positive family history (FH) for CRC occurred in 118 patients. The pathologic slides were reviewed for histological criteria for MSI (Bethesda guidelines), immunohistochemical analysis (IHC) for MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 proteins, through the avidin-biotin-peroxidase complex, and microsatellite instability (MSI) (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 and MONO-27). BRAF somatic mutation was analyzed in all cases with positive MSI. **RESULTS:** Of the 118 patients with HF, 61 (51.69%) met at least one of the revised Bethesda criteria. Thirty-six were female (59%), and the mean age was 53.2 years. Nine (14.7%) patients presented all Amsterdam criteria I. Fifty-two tumors were located in the left colon. MSI histopathological components included: intratumoral lymphocytes (47.5%), expansive characteristics of the tumor (29.5%) and mucinous component (27.8%) (Histological unstable components of MSI) in 44 (72%). IHC was abnormal in eight (13%) and MSI in 12 patients (20%). There was an association between the Amsterdam criteria I and MSI; and between IHC with MLH1 and PMS2. There was an association with the revised Bethesda criteria with: sex, mucinous histology and Crohn's like reaction; with MSI and IHC with PMS2 and MLH1. BRAF was performed in 12 patients with MSI positive, and all were negative. Patients who presented the revised Bethesda criteria 4 (CRC or cancer associated with SL, diagnosed in one or more first-degree relatives, with one of the neoplasms occurred before 50 years of age), had a 10.6 increased chance to display positive MSI. Based on the studied variables, we proposed a score to characterize the Lynch Syndrome. **CONCLUSIONS:** The frequency of Lynch Syndrome in patients who were submitted to cancer resection, and had a cancer familial history was 20%. The criterion 4 Revised Bethesda was associated more strongly with the presence of microsatellite instability in the studied population. The developed score contributes as a practical tool in the diagnosis of Lynch Syndrome.

Descriptors: 1.Colorectal neoplasms 2.Colorectal neoplasm hereditary nonpolyposis 3.Microsatellite instability 4.Immunohistochemistry 5.Proto-oncogene proteins B-raf 6.Practice guideline as topic

1 INTRODUÇÃO

A Síndrome de Lynch, também chamada de câncer colorretal não poliposo hereditário (HNPCC), é uma doença autossômica dominante, com penetrância entre 80 e 90%, transmissão vertical e sem preferência por sexo⁽¹⁾, acometendo aproximadamente 2 a 3% de todos os casos de câncer colorretais⁽²⁻³⁾. É determinada por mutação germinativa nos genes de reparo do DNA, sendo mais comumente afetados os genes hMSH2 (human mutS homolog 2; cromossomo 2p16) e o hMLH1 (human mutL homolog 1; cromossomo 3p21), em cerca de 90% dos casos. Os restantes 10% são causados por alterações nos genes MSH6 e PMS2⁽⁴⁻⁶⁾.

A perda da função dos genes de reparo do DNA ocasiona acúmulo de mutações no DNA deste indivíduo, processo denominado de instabilidade genômica, envolvendo áreas de microssatélites⁽⁴⁻⁶⁾.

As principais características clínicas da Síndrome de Lynch são: câncer colorretal (CCR) em idade precoce (abaixo dos 45 anos), predomínio no cólon direito (70%), maior incidência de tumores sincrônicos (3x) e metacrônicos (5 a 7x), rápido desenvolvimento do câncer, originado de adenomas, maior risco de neoplasias malignas do endométrio, ovário, intestino delgado, trato renal superior, estômago, trato biliar e pode estar associado com tumores de pele – adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos e ceratoacantomas (também conhecido como Síndrome de Muir-Torre)⁽⁴⁻⁹⁾.

Para facilitar a identificação clínica desses doentes, foram propostos os Critérios de Amsterdam⁽⁷⁾. Posteriormente, foram propostos os critérios de Bethesda para se indicar o “rastreamento” molecular do HNPCC (Teste de Instabilidade Microssatélite (MSI) do tumor, e/ou Imuno-histoquímica). Entretanto, um grande desafio no diagnóstico da Síndrome de Lynch é a baixa acurácia diagnóstica dos critérios clínicos utilizados ^(12-13,34).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia do câncer colorretal

O câncer colorretal (CCR) representa uma das neoplasias mais prevalentes nos países ocidentais, sendo a terceira neoplasia mais comum em todo o mundo^(1,2,3). A incidência do câncer colorretal está aumentando em países onde o risco era considerado baixo, como o Japão e outros países Asiáticos⁽¹⁴¹⁾. Nos países com alto risco para o desenvolvimento desse tipo de câncer, a incidência apresenta uma estabilidade ou até mesmo declínio, como é o caso dos países da Europa Ocidental, Norte Europeu, América do Norte e Austrália⁽¹⁰⁸⁾.

Sua epidemiologia tem despertado maior interesse nos últimos anos, em decorrência de recentes avanços no campo da Genética e Biologia Molecular⁽⁴⁾.

Devido ao resultado da interação de fatores genéticos e ambientais, o CCR pode ser dividido em três categorias de risco: esporádico, familiar e hereditário⁽⁶⁷⁾. O CCR esporádico acomete 70% de todos os CCR, origina-se de mutações somáticas e está associado com idade mais avançada. Aproximadamente 20-30% de todos os CCR são classificados como de origem familiar. Identificaram-se polimorfismos e susceptibilidade associada à *loci* de baixa penetrância com risco aumentado de CCR por associações genéticas e estudos populacionais nestes pacientes⁽⁶⁸⁻⁷⁰⁾.

Acredita-se que a imensa maioria dos tumores colorretais seja proveniente da malignização de pólipos colorretais, através da denominada sequência adenoma-câncer, fato que justifica os esforços para sua detecção precoce^(6,7). Entretanto, reconhece-se que no desenvolvimento do CCR estão envolvidos fatores de alto risco (idade avançada, doenças genéticas, doenças inflamatórias), risco moderado (dieta rica em carnes vermelhas, adenoma prévio, irradiação pélvica) e risco baixo (dieta rica em gorduras, álcool, tabagismo, obesidade, estatura alta, colecistectomia, consumo elevado de sacarose). Enquanto alguns desses fatores não são passíveis de modificação (idade e história familiar), outros (como os dietéticos) parecem exercer importante influência, pois, justificam as variações geográficas observadas nessa doença⁽⁵⁾.

A contribuição dos fatores genéticos baseia-se em duas observações indicativas de maior risco de câncer: (a) maior incidência de CCR entre pessoas com história familiar e (b) famílias nas quais muitos membros são afetados pela doença, indicando padrão de herança autossômica dominante de susceptibilidade⁽⁸⁾.

As alterações genéticas que causam o CCR podem ser divididas em: adquiridas, mutações somáticas que originam o câncer esporádico, responsável por 75 a 85% dos casos, cujo desenvolvimento, está associado a um fenômeno chamado instabilidade cromossomal (CNI), que indica número variável de ganhos e perdas nos cromossomos⁽⁸⁾. Da mesma forma, algumas alterações genéticas específicas, hereditárias ou não, podem conferir risco substancial para o desenvolvimento de CCR. Nesse contexto, a associação de CCR a síndromes hereditárias com mutação germinativa reconhecida perfaz

pouco menos de 5% do total de casos diagnosticados. Este grupo de pacientes é classificado de acordo com a ausência (Síndrome de Lynch ou HNPCC) ou presença de polipose colorretal ⁽⁸⁾.

2.1.1 Epidemiologia no Brasil

No Brasil, excluídos os tumores de pele não melanoma, estimam-se 395.000 casos novos de câncer, 204.000 para o sexo masculino e 190.000 para o sexo feminino, em 2014. O câncer colorretal representa a terceira neoplasia maligna mais incidente tanto em homens quanto em mulheres, com estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2014⁽²⁸⁾ apontando para 15.670 casos novos em homens (15,44 por 100.000 homens) e 17.530 casos novos em mulheres (17,24 por 100.000 mulheres).

Reproduzindo distribuição heterogênea observada em diferentes países do mundo, as estimativas do INCA revelam importantes diferenças por regiões do Brasil. No Sudeste é o segundo tumor mais frequente em homens (22,67/100.000) e o terceiro nas regiões Sul (20,43/100.000) e Centro-Oeste (12,22/100.000). Ocupa a quarta posição na região Norte (4,48/100.000) e a quinta na região Nordeste (6,19/100.000). Nas mulheres, é o segundo mais frequente nas regiões Sudeste (24,56/100.000) e Sul (21,85/100.000), o terceiro nas regiões Centro-Oeste (14,82/100.000) e Nordeste (7,81/100.000), e o quarto na região Norte (5,30/100.000)⁽²⁸⁾.

Rossi et al, pesquisaram mutações nos genes MLH1 e MSH2 em famílias Brasileiras com suspeita de câncer colorretal não polipoide hereditário

(HNPCC). Os familiares foram agrupados de acordo com os critérios de Amsterdam I ou II, dez mutações foram detectadas (10 de 25[40%]); de nove mutações diferentes, sete eram novas. O gene MLH1 teve o maior número de mutações do que o MSH2 (8 de 25[32%] vs. 2 de 25[8%]). Apenas três destas dez famílias preencheram os critérios de Amsterdam⁽¹¹⁹⁾.

Outro trabalho deste mesmo grupo, também mostrou a frequência de tumores extracolônicos em 60 famílias brasileiras com síndrome de Lynch que preenchiam os critérios de Amsterdam I e II. Um total de 2.095 indivíduos: CCR foi o tumor mais frequente nas famílias (334 casos). Duzentos tumores extracolônicos entre todos os indivíduos com maior frequência em mulheres (123 casos) do que em homens (77 casos). O câncer de mama (32 casos) foi o mais frequente entre as mulheres, seguido pelo câncer de endométrio (20 casos) e colo uterino (20 casos). Nos homens, o câncer de próstata (16 casos) e o de estômago (12 casos) foram os tumores extracolônicos mais frequentes⁽¹²⁰⁾.

Valentin et al, caracterizaram mutações germinativas do MLH1 e MSH2 na América do Sul em 123 indivíduos com suspeita de síndrome de Lynch. Mutações patogênicas foram encontradas em 28,45% (34/123) dos indivíduos, onde 25/57 (43,85%) preencheram os critérios de Amsterdam I, II e 9/66 (13,63%) os critérios de Bethesda. Treze alterações (35,14%) foram descritas como primeira vez. Os dados relatados neste estudo acrescentaram informações novas sobre mutações nos genes MLH1 e MSH2 e contribuíram para caracterizar melhor a síndrome de Lynch no Brasil, Uruguai e Argentina. A alta incidência de novas mutações demonstra a importância de definir mutações nos genes MLH1 e MSH2 em populações distintas com síndrome de Lynch⁽¹²¹⁾.

2.2 Síndrome de Lynch (SL)

2.2.1 Histórico

Warthin, professor e diretor de Patologia da Universidade de Michigan, fez um estudo sobre a natureza da hereditariedade do câncer, por meio da análise de um detalhado *pedigree* e documentação patológica de cânceres familiares em sua instituição⁽²⁹⁻³⁰⁾. Em 1913, relatou o *pedigree* da família G relacionada com outras associações cancerosas⁽³¹⁾. Esta foi a primeira documentação de uma família com a Síndrome de Lynch.

Estudos de duas grandes famílias ocidentais, publicados nos *Archives Internal Medicine*.⁽³⁵⁾ chamaram a atenção de A. James French, diretor de Patologia de Michigan, que encorajou Lynch a estudar o material de Warthin sobre a família G. Após mais de 50 anos, Henry T. Lynch descreveu a doença que daria seu nome⁽²⁹⁻³⁰⁾. As análises do *pedigree* da família deste paciente formaram as bases para a Síndrome de Lynch (“Fatores hereditários no câncer”), em 1966.

Lynch e Krush⁽²⁹⁻³⁰⁾ atualizaram os dados da família e publicaram, em 1971, dados coletados de mais de 650 membros da mesma família. Notaram-se muitos aspectos ainda não relatados da síndrome, incluindo: 1) incidência aumentada de adenocarcinomas, principalmente de cólon e endométrio; 2) risco aumentado para múltiplos tumores; 3) herança autossômica dominante; 4) início precoce do câncer⁽²⁹⁻³⁰⁾.

As ideias de Lynch aos poucos ganharam força, particularmente nas comunidades internacionais, culminando na organização do Grupo

Colaborativo Internacional em Câncer Colorretal Hereditário Não Polipoide. O grupo composto por 30 líderes de oito países se reuniu em Amsterdam e formulou uma série de critérios clínicos (hoje conhecidos como critérios de Amsterdam) em 1990. Estes critérios serviram como ponto de partida para outras investigações (Anexo I). Em 1998, os critérios de Amsterdam foram reformulados, reconhecendo o significado de subtipos de tumores extracolônicos (isto é, endométrio, intestino delgado, ureter e pélvis renal). Estes critérios revisados de Amsterdam II estão apresentados no Anexo I^(12,13).

A caracterização molecular da Síndrome ocorreu a partir do estudo de Peltomaki et al.⁽²¹⁾ que associaram a doença (a duas grandes famílias encontrando os critérios de Amsterdam originais) a alteração em um *locus* no cromossomo 2p. Em seguida, três grupos, independentemente, relataram fenótipo molecular peculiar no CCR caracterizado por alterações frequentes na longa série de sequências repetitivas simples, fenômeno no qual os grupos chamaram erros replicativos (RERs), MSI, mutações somáticas em sequências repetitivas simples que se encontravam em todos os lugares.

Aaltonen et al.⁽⁹⁾, acharam o fenótipo de erros replicativos em 11/14 (79%) em tumores HNPCC e 6/46 (13%) dos CCR esporádicos. Os tumores esporádicos RER+ têm predominância no cólon direito e são diploides parecidos com os casos do HNPCC.

Thibodeau et al.⁽²²⁾ encontraram alguns graus de MSI em 25/90 (28%) dos CCR, ligando este fenômeno à localização proximal e melhora da sobrevida, demonstrando relação inversa com a perda da heterozigosidade.

O grupo de Ionov⁽³²⁾ também relatou mutações somáticas de sequências repetitivas simples em 12% dos CCR, as quais foram relativamente mais comuns em mulheres e estavam associadas com a localização do lado direito, histopatologia pouco diferenciada, raras mutações KRAS e p53 e estágios menos avançados do tumor. No final de 1993, identificou-se a participação do MSH2, relevante gene localizado no 2p, cujas mutações ocorreram nas famílias com a Síndrome de Lynch. Um segundo *locus* da doença estava ligado ao 3p e no início de 1994, notaram-se mutações em famílias com Síndrome de Lynch. A demonstração da doença causada por mutações em PMS2 e MSH6 ocorreram posteriormente⁽³³⁻³⁴⁾.

Nos últimos 15 anos, as aplicações destes conhecimentos melhoraram o entendimento da incidência e fenótipo da doença. O Instituto Nacional do Câncer Americano (NCI) dedica-se a emissão de diretrizes (“Bethesda guidelines”) para identificar pacientes que poderiam se beneficiar com testes clínicos para a SL. Os critérios de Bethesda revisados são apresentados no Anexo II.

2.2.2 Terminologia

Lynch introduziu o termo HNPCC em 1985, enfatizando a natureza hereditária da predisposição para o CCR na ausência de polipose comum; o termo ganhou aceitação^(12,20,37).

Boland e Troncale⁽³⁷⁾ fizeram a primeira referência para a Síndrome de Lynch em um relato de caso em 1984. HNPCC e SL têm sido usados com frequência como sinônimos^(13,15).

O termo “HNPCC” é problemático por várias razões e nos encoraja o uso do termo “Síndrome de Lynch”, sendo uma opinião compartilhada por muitos⁽³⁷⁻³⁸⁾. Primeiro, o HNPCC é um descritor inexato e potencialmente equivocado do fenótipo da doença. Ele significa ausência de pólipos colorretais, mas não é o caso. Os pacientes com Lynch têm apresentado similar número de pólipos que a população geral⁽³⁹⁾. Ele também falha em reconhecer o maior espectro de neoplasias associadas, incluindo carcinomas de endométrio, estômago, intestino delgado, ovário, ureter, pelve renal e pele. O mais importante é que o termo HNPCC tem sido aplicado para dois grupos de sobreposição de pacientes: aqueles que preenchem os critérios de Amsterdam e os que mostram aspectos clínicos, histopatológicos e moleculares com mutação demonstrável em um dos genes de reparo do DNA. Esta confusão é parcialmente atribuível à associação do HNPCC com os critérios de Amsterdam antes da demonstração das bases genéticas moleculares da doença.

Lindor et al.⁽³⁷⁾ demonstraram que para mais de 40% dos pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam I, falta evidência de deficiência hereditária em MMR. Estudando 161 famílias com critérios de Amsterdam I, classificaram estas famílias em dois grupos, baseados no estado MSI do tumor. Neste estudo, o estado MSI-H (MSI-High) serviu como um substituto para o gene MMR para aqueles que apresentavam história familiar forte. A incidência de CCR nos parentes de primeiro e segundo graus dos pacientes com tumores MSI-H foi 6,1 vezes maior (intervalo de confiança de 95%, variando de 5,2 até 7,2) ($p < 0,01$); estes membros da família foram também de risco estatisticamente significativo para a típica natureza de tumores extracolônicos

associados ao Lynch. O risco de CCR em famílias com baixa incidência de tumores microssatélites instáveis, MSI-L (MSI-Low) ou microssatélites estáveis foi significativamente menor (razão de chance de 2,3), e falharam em demonstrar risco aumentado para tumores extracolônicos. Com bases nestes resultados concluíram que a população que preenche aos critérios de Amsterdam é composta por pelo menos dois grupos: 1. Famílias com evidência de dMMR hereditário, exibindo aspectos clínicos da síndrome com predisposição ao câncer descrita por Lynch e 2. Famílias sem evidência de dMMR hereditário. Eles atribuíram o risco aumentado para o CCR neste segundo grupo, por combinação de agrupamento familiar, meio ambiente e alguns genes ainda não descobertos. Para o primeiro grupo, eles encorajaram o uso do termo diagnóstico “Síndrome de Lynch” e para o segundo, eles propuseram o descritor CCR familiar tipo X. Estes achados têm sido validados por outros autores⁽⁴⁰⁾.

2.2.3 Carcinogênese

O desenvolvimento do CCR resulta do acúmulo de mutações em genes cruciais para o controle do crescimento e diferenciação celulares⁽⁷¹⁾. Até pouco tempo, existiam duas vias principais de instabilidade genômica, aparentemente independentes: a via supressora (VS), caracterizada por alteração sequencial de genes supressores tumorais e proto-oncogenes, cujos tumores apresentam instabilidade cromossômica, e a via mutadora (VM), caracterizada pela presença de mutações em genes de reparo do DNA, cujos tumores

apresentam instabilidade de microssatélites⁽⁷²⁾. Recentemente, foi descrito uma nova via de carcinogênese para o CCR através das Síndromes de poliposes serrilhadas (SPS). Hoje, sabe-se que alguns pólipos hiperplásicos fazem parte da Síndrome dos pólipos serrilhados (PS), que incluem diferentes tipos de lesões com característica histológica comum, a aparência em “dentes de serra”, com potencial de transformação para CCR através da chamada “via serrilhada”^(116,122-124). Durante a última década houve troca no paradigma que considerava os adenomas como os únicos precursores de CCR. Os PS se classificam em pólipos hiperplásicos (PH), adenoma ou pólipo serrilhado sésil (ASS) e adenoma serrilhado tradicional (AST). Os PS considerados de risco são os de localização proximal ao sigmoide, maiores ou igual a 10mm e os que apresentam displasia associada (ASS com displasia ou AST)⁽¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾. A SPS é uma entidade de descrição recente, para a qual existem múltiplas incógnitas, principalmente em relação ao diagnóstico, sua possível causa genética, história natural, fenótipo clínico e molecular.

Cerca de 90% dos CCR associados à Síndrome de Lynch seguem a VM da carcinogênese, traduzida pela presença de instabilidade de microssatélites⁽⁷³⁻⁷⁴⁾.

A Síndrome de Lynch é determinada por mutação germinativa nos genes de reparo do DNA, sendo mais comumente afetados os genes hMSH2 (human mutS homolog 2; cromossomo 2p16) e o hMLH1 (human mutL homolog 1; cromossomo 3p21), em cerca de 90% dos casos. Os restantes 10% são causados, na quase totalidade, por alterações nos genes MSH6 e PMS2^(13,15,20).

Recentemente, descreveu-se uma alteração gênica que ocasiona a Síndrome de Lynch envolvendo o gene das moléculas de adesão das células

epiteliais EPCAM ou deleção final 3' constitucional dos exons do TACSTD1 (cromossomo 2p21) ⁽¹²⁵⁻⁶⁾.

A principal característica genética é a perda da função dos genes responsáveis pelo reparo do DNA, com consequente acúmulo de mutações no DNA deste indivíduo, a qual irá desencadear o processo de carcinogênese ^(13,15,20).

Para entender os mecanismos envolvidos nesta síndrome, é necessário explicar algumas definições. Microssatélites representam sequências de DNA constituídas por repetições de dois ou três nucleotídeos que passam de uma geração para outra de forma permanente. As repetições contidas nos microssatélites variam entre indivíduos (por isso são considerados polimórficos), mas essa quantidade se mantém estável em todas as células de uma pessoa (germinativas ou somáticas).

No entanto, quando ocorre defeito no sistema que zela pela integridade do mecanismo de replicação do DNA, o número de repetições dos microssatélites se torna instável, com expansões e contrações da sequência do DNA. Esse fenômeno, conhecido como Instabilidade de Microssatélites (MSI) é particularmente evidente em certas neoplasias, como os tumores colorretais provenientes de mutações herdadas nos genes de reparo do DNA. Assim, quando defeituosos, os genes de reparo geram instabilidade genômica caracterizada por numerosos erros de replicação (em relação ao pareamento na sequência de nucleotídeos), resultando em alterações no emparelhamento do DNA. Além dos tumores hereditários, a MSI é encontrada também em aproximadamente 15% dos tumores esporádicos ^(9,10,11)

2.2.4 Características clínicas

O HNPCC é uma doença autossômica dominante, com penetrância entre 80 e 90%, transmissão vertical e sem preferência por sexo⁽⁵²⁾, acometendo aproximadamente 2-3% de todos os casos de câncer colorretais⁽⁵⁴⁻⁵⁵⁾.

Os indivíduos afetados podem desenvolver adenomas colônicos com maior frequência do que a população geral, e a penetrância ao longo da vida para o desenvolvimento do câncer colorretal é de 50 a 80%⁽⁵⁶⁾. Muto et al.⁽⁵³⁾, sugerem que na população, a ocorrência da transformação do adenoma para carcinoma demore entre 10 e 15 anos. Porém, em pacientes com HNPCC, esse processo é mais acelerado pela falta de eficiência nos processos naturais da célula no reparo do DNA, o que torna os adenomas mais agressivos. Apesar disso, relatos de transformação maligna em intervalo menor que dois anos são raros.

As principais características clínicas da Síndrome de Lynch são: CCR em idade precoce (abaixo dos 45 anos), com média de idade ao diagnóstico entre 42 a 61 anos^(17,56), quando comparado à idade de 71 anos na população geral⁽⁷⁶⁾. A média de idade do diagnóstico do câncer endometrial é de 47 a 55 anos em alguns estudos, que é mais cedo do que na população geral^(56,77,78). Em contraste, outros estudos encontraram média de idade do diagnóstico de câncer do endométrio de 62 anos, sendo a mesma da população geral^(76,79).

Os pacientes com Síndrome de Lynch têm idade precoce ao diagnóstico de CCR, e quando isto ocorre, a sobrevida destes pacientes quando comparados ao do tipo esporádico é maior. Isto pode ser demonstrado em estudo Finlandês, com 1/3 de mortalidade menor no CCR associado à

Síndrome de Lynch⁽⁸⁰⁾. Em concordância, sobrevida de cinco anos de CCR associado à Síndrome de Lynch foi de 53% quando comparado a 35% para o CCR do tipo esporádico⁽⁸¹⁾, podendo ser atribuído às observações de que os cânceres na Síndrome de Lynch têm menor risco para metástases. Predomínio no cólon direito (70%), maior incidência de tumores sincrônicos (3x) e metacrônicos (5 a 7x). A frequência de CCR sincrônicos para a SL é 18% e de metacrônicos é 30% em 10 anos e 50% em 15 anos^(82,84). Em comparação, o risco de CCR sincrônicos e metacrônicos nos casos esporádicos é 2 a 4% e 2 a 3%, respectivamente^(81,83). O rápido desenvolvimento do câncer, originado de adenomas, maior risco de neoplasias malignas do endométrio, ovário, intestino delgado, trato renal superior, estômago e trato biliar, associação com tumores de pele – adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos e ceratoacantomas (também conhecido como Síndrome de Muir-Torre), faz a caracterização desta Síndrome^(12,13,15,17,20,35).

Câncer Colorretal Familiar tipo X: Recentemente, foram descritas famílias que preenchem os Critérios de Amsterdam, mas cujos CCR não apresentam instabilidade de microssatélites, e em que não se identificam mutações nos genes de reparo do DNA. Lindor et al.⁽⁷⁵⁾ sugeriram denominar esta nova entidade como Carcinoma Colorretal Familiar do tipo X, uma vez que a sua base genética ainda não foi estabelecida.

Para facilitar a identificação clínica desses doentes, foram propostos os Critérios de Amsterdam⁽¹²⁾, que foram revisados em 1998, passando a incluir os tumores extracolônicos (endométrio, ureter, pélvis renal, intestino delgado, estômago), ficando conhecidos como Critérios de Amsterdam II⁽¹³⁾.

Os Critérios de Amsterdam I reúnem três ou mais parentes com CCR, mais todos os seguintes critérios: a) Um paciente acometido deve ser parente de primeiro grau dos outros dois; b) CCR deve ser encontrado em pelo menos duas gerações; c) Pelo menos um caso de CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade, excluindo-se o diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (Anexo I).

A sensibilidade dos Critérios de Amsterdam I varia de 54 a 91% e a especificidade de 62 a 84%, com grande heterogeneidade entre os estudos (homogêneos quanto à sensibilidade e heterogêneos quanto à especificidade)⁽¹⁴⁾. Segundo meta-análise de 2004, os Critérios de Amsterdam II possuem maior sensibilidade 78%, porém menor especificidade, variando de 46 a 68%, destacando-se que na utilização destes critérios, 22% dos pacientes portadores de mutação MLH1 e MSH2 podem não ser diagnosticados⁽¹⁴⁾.

Contudo, a identificação de alterações patogênicas nos genes relacionados à Síndrome de Lynch é bastante trabalhosa e a indicação dessa pesquisa tem que ser criteriosa. Assim, devido à baixa sensibilidade dos Critérios de Amsterdam, em 1997 foram elaborados os critérios de Bethesda (Anexo II) com o objetivo de selecionar os pacientes que devem ser submetidos ao “rastreamento” para diagnóstico do HNPCC, através do Teste de Instabilidade Microssatélite (MSI) do tumor ou Imuno-histoquímica. A pesquisa de MSI requer a coleta de tecido tumoral para determinar a chance de existir mutação patogênica em um dos genes que fazem o reparo do DNA. Quando há instabilidade, essa probabilidade é grande.

Já a definição do gene responsável pode ser facilitada pelo uso da imuno-histoquímica no tecido tumoral, voltada para a detecção de proteínas codificadas por esses genes. Quando não ocorre reatividade para uma delas, aumenta a chance de a mutação estar localizada no gene que codifica essa proteína, razão pela qual seu sequenciamento deve ser priorizado.

Os critérios de Bethesda estão presentes em mais de 90% dos pacientes com HNPCC, apresentando maior sensibilidade (89%) e especificidade de 53%⁽¹⁴⁾. Outros estudos indicam que eles apresentam maior sensibilidade (94%), seguidos pelos Critérios de Amsterdam II (72%) e Critérios de Amsterdam I (61%)⁽¹⁵⁾.

Os critérios de Bethesda revisados incluem a presença de um ou mais aspectos histopatológicos associados com a MSI, isto é, a presença de tumor infiltrado por linfócitos, reação linfocítica semelhante à Doença de Crohn, diferenciação mucinosa ou anel de sinete e um modelo de crescimento sólido, indiferenciado ou medular. Os critérios revisados de Bethesda não proporcionam detalhes no valor preditivo destes aspectos, ambos sozinhos ou em combinação, mas recomenda teste de MSI e/ou imuno-histoquímica de proteínas de reparo do DNA para tumores colorretais diagnosticados antes dos 50 anos e para pacientes entre 50 e 59 anos que apresentem um ou mais dos aspectos histopatológicos citados.

Dessa forma, a histologia do tumor pode ser útil não só para a triagem de tumores para teste de perda da função do gene de reparo, como também, para facilitar o diagnóstico de alguns CCR de início tardio e que apresentem pouca ou nenhuma história pessoal ou familiar sugestiva da Síndrome de Lynch⁽¹⁶⁾.

Os critérios de Bethesda revisados foram propostos para melhorar a precisão na identificação dos pacientes com Síndrome de Lynch ⁽¹⁵⁾. Hampel et al. ⁽¹⁸⁾ chamaram a atenção para limitações destes critérios, observando que em uma coorte populacional de 1066 pacientes com CCR, cinco de vinte e três portadores da mutação não preencheram os critérios de Bethesda ou Bethesda revisados e poderiam ao contrário, não teriam sido diagnosticados se a avaliação genética fosse limitada a indivíduos que preenchem estes critérios.

Atualmente, duas abordagens principais estão disponíveis para identificar indivíduos e famílias com risco para a Síndrome de Lynch: 1. abordagem chamada de critério universal, testa todos os casos de CCR em pacientes com menos de setenta anos; 2. abordagem alvo (baseada na idade ou critérios de história familiar), seguidos pelo teste genético, para aqueles considerados de risco aumentado ⁽¹²⁷⁾.

Ainda que a estratégia universal seja custo-efetiva, ela poderá falhar em identificar casos onde mutações nos genes de reparo interrompam a sua função, mas não resulte em instabilidade de microssatélites, como visto nos casos de mutações no MSH6 ou quando resultados da IHC são normais apesar de uma proteína MMR não funcionante (alterações em outros genes) ⁽¹²⁷⁾.

2.2.5 Modelos de Predição Genéticos

Modelos preditivos foram desenvolvidos para quantificar o risco de detectar uma mutação baseado na história pessoal e familiar, ajudando a decidir quem poderia ser encaminhado para mais avaliação e/ou teste genético.

O primeiro modelo preditivo foi desenvolvido em 1998 para a identificação de mutações de pontos em MLH1 e MSH2 ⁽¹²⁸⁾. Em 2004, um modelo de predição chamado Amsterdam plus, foi desenvolvido a partir de uma população com câncer familiar que adicionou cinco variáveis para o critério de Amsterdam para melhorar suas habilidades em prever mutações nos genes de reparo: número de CCR e câncer endometrial na família, número de indivíduos com dois ou mais CCR ou endometrial, média de idade do diagnóstico e número de indivíduos com cinco ou mais adenomas ⁽¹²⁹⁾. Em 2006, três modelos foram propostos: MMRPredict, MMRPro e PREMM1,2 (“Prediction of Mismatch Repair Gene Mutations in MLH1 and MSH2”) ⁽¹³⁰⁻¹³²⁾. Este último modelo foi ampliado para incluir mutações no gene MSH6 e substituído por modelo PREMM1,2,6 (“Prediction of Mismatch Repair Gene Mutations in MLH1, MSH2, and MSH6”) ⁽¹³³⁾.

O modelo de Barnetson et al ⁽¹³⁰⁾, o PREMM ^(132,134-135) e o MMRPro ⁽¹³¹⁾ foram introduzidos para quantificar probabilidade individual de ter mutação nos genes de reparo mais comumente associada com a Síndrome de Lynch.

Barnetson et al ⁽¹³⁰⁾ analisaram uma coorte populacional de 870 pacientes diagnosticados com CCR antes dos 55 anos. Eles desenvolveram modelo para prever mutações MLH1, MSH2 e MSH6 usando análise de regressão multivariável. O modelo incluiu idade do paciente, sexo, localização do tumor, presença de CCR sincrônicos e metacrônicos, história familiar de câncer endometrial e CCR, resultados da instabilidade de microssatélites e imuno-histoquímica no tumor. Foi validado em 155 pacientes com CCR diagnosticado antes dos 45 anos, tem uma sensibilidade de 62%,

especificidade de 97% e valor preditivo positivo de 80%. Entretanto, este modelo foi desenvolvido e validado em pacientes jovens com CCR e não inclui outros cânceres associados à Síndrome de Lynch, somente o câncer endometrial.

O modelo PREMM (previsão de mutações em MLH1 e MSH2) ⁽¹³⁴⁻¹³⁵⁾ foi desenvolvido usando uma coorte de 1914 indivíduos com risco moderado para Síndrome de Lynch ⁽¹³²⁾. Dados clínicos de 898 probandos foram usados para modelo de derivação. O modelo foi validado em uma grande coorte separados dos probandos. O modelo de regressão logística multivariável final incluiu diagnóstico de CCR, adenomas colônicos, cânceres extracolônicos associados à Síndrome de Lynch e história familiar de cânceres associados à Síndrome de Lynch. Entretanto, o modelo PREMM ⁽¹³⁴⁻¹³⁵⁾ não considera o tamanho da família ou membros da família não afetados.

O modelo MMRPro usa estimativas da prevalência e a penetrância de mutações nos genes de reparo para estimar a probabilidade de carregar mutação clinicamente significativa nos genes de reparo. O modelo também pode estimar a probabilidade de desenvolvimento de CCR ou endometrial em parentes não afetados e incorpora dados da MSI. Para indivíduos com resultados de testes genéticos indeterminados ou não informativos, o modelo MMRPro pode fornecer probabilidade de detecção de mutação deletéria pós-sequenciamento. Estas estimativas são particularmente valiosas dado que o teste genético tem limitações na sensibilidade e pobre aderência na recomendação de rastreio de câncer ⁽¹³⁶⁾.

2.2.6 Histopatologia

As características histopatológicas do tumor associado à Síndrome de Lynch incluem: cânceres mucinosos, compostos por mais do que 50% de células produtoras de mucina e câncer com células em anel de sinete, contendo mais do que 50% de células em anel de sinete^(147,85); carcinomas com crescimento expansivo^(146,85) ; linfócitos infiltrando tumor, os quais são consistentes com coexpressões citotóxicas de células T CD3/CD8 e linfócitos peritumorais; lesões Crohn`s-like, que são agregados linfoides nodulares infiltrando a superfície do tumor ^(43-46,85), tumores pouco diferenciados e/ou heterogêneos ^(20,43-45,47-52).

Nas famílias com câncer colorretal familiar tipo X (FCCTX), os aspectos clínicos e histopatológicos diferem significativamente do câncer colorretal da Síndrome de Lynch.

Os tumores colorretais do tipo X se desenvolvem em média de idade maior, são predominantemente localizados no cólon distal e frequentemente mostram arquitetura tubular, projeções serrilhadas, margem do tumor infiltrativa e necrose suja, entretanto, reações linfocíticas são raras. A natureza molecular dos tumores FCCTX permanece obscura, e a morfologia do tumor é consistente com mecanismos genéticos diferentes dos defeitos dos genes de reparo MMR que causam a Síndrome de Lynch⁽⁸⁶⁾.

2.2.7 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica analisa a expressão das proteínas de reparo proporcionando informações de qual gene está envolvido, para posterior sequenciamento genético.

A perda de expressão das proteínas de reparo apresenta acurácia elevada na identificação da deficiência dos genes de reparo. Empregam-se os anticorpos para hMLH1, hMSH2, hMSH6 e hPMS2⁽⁴¹⁾. Considera-se alterado quando há ausência de marcação das células tumorais. Os controles internos positivos são compostos por linfócitos, células do centro germinativo e enterócitos⁽⁴²⁾.

Em tumores esporádicos MSI-H, devido a hipermetilação patológica do “promoter” hMLH1 (CpG island. Methylator phenotype), existe perda consistente da expressão do hMLH1⁽⁴³⁾, logo este aspecto, sozinho, pode não diferenciar entre MSI-H esporádico e Síndrome de Lynch.

Na Síndrome de Lynch, a alternância nas mutações dos genes de reparo é numerosa e variável. Enquanto muitas mutações irão resultar na perda total da expressão de proteína, em alguns casos de mutações “missense” irão resultar em perda da função das enzimas de reparo, mas a proteína irá ser expressa e detectável pela imuno-histoquímica. Grandes deleções e mutações truncadas (“non-sense”) usualmente ocasionam níveis indetectáveis de proteínas de reparo nos ensaios imuno-histoquímicos, caracterizando mutações nos genes MLH1 e MSH2 que acometem mais de 90% dos casos da

Síndrome de Lynch; 5 a 10% envolvem o MSH6 e raramente o PMS2. O significado patogénético da perda presumida de função devido à mutação “missense” com proteína MMR detectável, não é inteiramente clara e recomenda-se cautela na interpretação de tais achados ⁽⁴⁸⁾.

Algumas perdas de função de mutações hMLH1 com proteína imuno-histoquimicamente detectável, entretanto, poderia ainda ser detectada pela imuno-histoquímica como perda de expressão da proteína hPMS2⁽⁴⁷⁾. A proteína PMS2 forma heterodímeros com a proteína MLH1, instabilidade funcional (mutação “missense”) do MLH1 e pode levar a perda de PMS2 (“abrogation” do complexo) detectável na imuno-histoquímica. Enquanto a marcação negativa para PMS2 é aparentemente secundária e indica presença possível de mutações “missense” no gene MLH1 ⁽⁴⁸⁾. A identificação de mutações em PMS2 é um tanto difícil devido a presença de uma grande família pseudogenes PMS2 homólogos⁽⁴⁹⁻⁵⁰⁾.

A imuno-histoquímica pode detectar casos com genes de reparo deficientes que podem ser potencialmente não detectados pelo teste de instabilidade microssatélites. As mutações em MSH6 tendem a resultar em coloração fraca ou ausência de instabilidade microssatélites nos tumores, fenómeno também bem demonstrado ambos por estudos de linhagem celular e por estudos com MSH6-mutante em ratos. Estes casos de MSH6 podem ser não incluídos no teste de instabilidade microssatélites, mas podem ser detectável pelo MSH6 na IHC.

2.2.8 Instabilidade de microssatélites

Fenótipo molecular inicialmente identificado em neoplasias colorretais hereditárias não associadas à polipose (síndrome de Lynch) e posteriormente, relacionado a subgrupo de neoplasias esporádicas de características clínico-patológicas próprias^(9,21-22). É caracterizada por alterações esparsas ao longo do genoma envolvendo o comprimento de sequências repetitivas mono, di, tri ou tetranucleotídica e designadas microssatélites. Atribui-se a origem de tais alterações a perda de fidelidade do processo de replicação do DNA, decorrente do não reparo dos erros de pareamento que normalmente ocorrem na fase S do ciclo celular⁽²³⁻²⁴⁾.

Bocker et al.⁽²⁵⁾ chamaram atenção para a falta de padronização na interpretação de resultados em diferentes centros por eles estudados na Alemanha. O mesmo foi simultaneamente apontado por Diemaier et al.⁽²⁶⁾ com relação a ausência de critérios diagnósticos e quais marcadores microssatélites investigar na triagem de pacientes para estudos subsequentes de sequenciamento. Em decorrência disto, realizou-se a padronização dos critérios para identificação molecular do fenótipo MSI no encontro no NCI em 1997⁽²⁷⁾. Neste encontro foi formalmente adotado o termo instabilidade de microssatélites para se referir ao fenótipo molecular caracterizado por alterações em sequências genômicas repetitivas, sendo recomendada investigação de painel de cinco marcadores para definição deste fenótipo. Foram ainda definidos os tipos microssatélite estáveis (MSS), microssatélite instáveis de baixa frequência (MSI-L) e microssatélites instáveis de alta

frequência (MSI-H) a depender se nenhum, apenas um ou dois ou mais marcadores avaliados estivessem alterados⁽²⁷⁾.

2.2.9 BRAF

O gene BRAF é um proto-oncogene, localizado no braço longo (q) do cromossomo 7, na posição 34, (7q34). Este gene produz a proteína chamada B-Raf, conhecida como uma das proteínas quinase serina/treonina.⁽¹⁰⁹⁻¹¹⁰⁾

Está envolvida no envio de sinais para o interior das células, que estão diretamente relacionados ao crescimento celular.

Esta proteína faz parte da via de sinalização conhecida como RAS/MAPK, ajudando no controle de várias funções celulares importantes. Especificamente, a via RAS/MAPK regula o crescimento e divisão (proliferação) de células, processo pelo qual células maduras cuidam de funções específicas (diferenciação), movimento celular (migração) e destruição celular própria (apoptose). Ademais, a sinalização química através desta via é essencial para o desenvolvimento normal antes do nascimento⁽¹⁰⁹⁻¹¹⁰⁾.

Mutações somáticas no gene BRAF são comuns em vários tipos de câncer. Normalmente, a proteína B-Raf é ativada e desativada em resposta aos sinais que controlam o crescimento e desenvolvimento celular. Mutações somáticas fazem com que a proteína B-Raf seja continuamente ativada e transmita mensagens para os núcleos das células. A proteína superativada pode contribuir para o crescimento de cânceres através do crescimento anormal das células e divisão descontrolada.

Mutações ativando o BRAF são encontradas em 5 a 25% dos casos de CCR, com vasta maioria no BRAFV600E. A mutação no BRAFV600E ocorre em dois terços dos CCR com MLH1 silencioso devido à hipermetilação somática, mas nunca virtualmente em CCR com MSI devido à Síndrome de Lynch (SL) ⁽⁹⁵⁾. Entretanto, a mutação BRAFV600E é usada como marcador para hipermetilação em tumores MLH1 com imuno-histoquímica negativa. Ademais, o teste para SL é comumente oferecido nos casos com MLH1 negativos, apenas se eles são BRAF do tipo selvagem ⁽⁹²⁾.

Mutação BRAFV600E também ocorre em tumores microsatélites estáveis (MSS). Este grupo tem aparecido com fenótipo clínico e molecular distinto e prognóstico ruim ⁽¹¹¹⁻¹¹³⁾. A mutação do BRAFV600E é mutuamente exclusiva com a mutação KRAS⁽¹¹⁴⁻¹¹⁵⁾.

3 OBJETIVOS

A partir da caracterização clínica com história familiar, imuno-histoquímica, instabilidade de microssatélites e pesquisa da mutação para BRAF, os objetivos desta pesquisa incluíram:

1. Avaliar a frequência de SL em pacientes submetidos a tratamento cirúrgico por câncer colorretal e com história familiar de câncer.
2. Avaliar quais dos critérios clínicos, histopatológicos, imuno-histoquímico, e/ou de instabilidade de microssatélites seriam mais informativos no diagnóstico desta síndrome na população brasileira.

4 MÉTODOS

4.1 Casuística e amostras

Inicialmente, foi realizada uma análise de todos os casos de câncer colorretal diagnosticados no período de janeiro de 2005 até dezembro de 2008, e que foram atendidos no ambulatório de Coloproctologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP). Foram operados 477 pacientes com câncer colorretal durante este período, e destes, 19 pacientes apresentavam outras doenças associadas como Polipose Adenomatosa Familiar, Doença Inflamatória Intestinal, GIST, Linfoma e Sarcoma Intestinal, ou tinham realizado radioterapia pré-operatória sendo retirados do estudo. Dos 458 casos restantes, 118 apresentavam histórico familiar de câncer, por meio de informações contidas no prontuário médico. Estes pacientes foram então selecionados para entrevista e aplicação da ficha padronizada com os Critérios de Amsterdam I, II e Bethesda revisados (Anexo IV). Após a aplicação do questionário para estes pacientes ou familiares mais próximos, quando o paciente havia falecido, foram selecionados sessenta e um casos de pacientes com adenocarcinomas, em diversos graus de estágio, por satisfazerem os critérios de inclusão conforme abaixo relacionados.

Todos os pacientes estudados eram de famílias distintas. Foram realizados pedigree até a terceira geração dos familiares.

Os tumores que apresentavam localização distal a flexura esplênica, foram considerados como do cólon esquerdo e os com localização proximal a flexura esplênica, como do cólon direito.

Seleção dos pacientes

4.2 Critérios de inclusão

- a) Pacientes com diagnóstico de câncer colorretal e que tinham história familiar de câncer, e que tinham pelo menos um critério de Bethesda revisado.
- b) Pacientes que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

4.3 Critérios de exclusão

- a) Doentes com Retocolite Ulcerativa.
- b) Doença de Crohn.
- c) Quimioterapia e radioterapia pré-operatória.
- d) Polipose Familiar de qualquer tipo.
- e) Aqueles que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

4.4 Variáveis anatomopatológicas

Procedeu-se a revisão das lâminas para obtenção de informes anatomopatológicos relacionados à Síndrome de Lynch, nos arquivos do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas – HCFMUSP, utilizando a classificação para tumor colorretal da Organização Mundial da Saúde ⁽³⁶⁾. Foram incluídos os seguintes aspectos histopatológicos: adenocarcinoma, carcinoma mucinoso, carcinoma com células em anel de sinete ou carcinoma medular. Grau de diferenciação: relatados em escala de três graus (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado/indiferenciado) ^(36,141-2).

Componente Mucinoso: definido quando no mínimo 50% da área do tumor apresentavam-se compostas de mucina secretória.

Componente Anel de Sinete: definido quando no mínimo 50% do tumor contivessem células em anel de sinete.

Componente Medular: definido como carcinomas de tipo “medular”, que são aqueles tumores sólidos formados por blocos, ninhos ou trabéculas de células tumorais com alto grau nuclear, numerosas figuras de mitose, escasso citoplasma e denso infiltrado inflamatório na periferia da lesão. As bordas da lesão são bem definidas em relação ao parênquima de tecido normal adjacente (geralmente tumores com bordas arredondadas ou lobuladas).

Linfócitos Intratumor: foram pontuados como presentes, quando existiam no mínimo cinco linfócitos em um campo de (x40) entre dez campos examinados.

Reação Crohn-like: definido como agregados linfoides com ou sem formação de centros germinativos na periferia do tumor e não associados a linfonodo.

Expansivo: definido como bordas do tumor expansivas, ou seja, empurram o tecido normal adjacente ao invés de infiltrá-lo ^(36,141-2).

4.5 Ensaios imuno-histoquímicos

Os procedimentos imuno-histoquímicos foram realizados em conjunto pelas equipes do LIM-14 [Patologia hepática] FMUSP, e Laboratório de Imuno-histoquímica da Divisão de Patologia do Instituto Adolfo Lutz.

4.5.1 Anticorpos primários utilizados e padronização dos ensaios

Para o presente estudo foram utilizados anticorpos primários monoclonais gerados em camundongos e dirigidos contra os antígenos, produtos dos genes codificadores das enzimas de reparo dos erros de pareamento do DNA: anti-MLH1 hum purif, clone G168-15, Becton Dickinson, cod. 550838 (RR-002-12155), lote 83115; anti-MSH2 hum purif, clone G2019-1129, Becton Dickinson, cod.556349 (RR-002-05885), lote 23665; anti-MSH6 (GTBP) 150ug, Becton Dickinson, clone 44/MSH6, cod. 610919 (RR-002-17297), lote 64559; anti-PMS2 hum/cam purif, clone A16-4, Becton Dickinson, cod. 556415 (RR-002-13805), lote 76080. As condições ideais do ensaio para cada um dos antígenos pesquisados foram determinadas mediante avaliação das diversas variáveis envolvidas na execução das reações imuno-histoquímicas, referentes às condições de recuperação antigênica em calor úmido, título do anticorpo primário e sistema de revelação, conforme descritos a seguir:

- a) Recuperação antigênica (RA): testada em pH=6,0 e pH=3,0 (tampão citrato de sódio 10mM) e pH=9,0 (tampão Tris-EDTA 1mM), executadas tanto em panela de pressão por 3 minutos, quanto panela a vapor por 40 minutos;
- b) Título do anticorpo primário: para os quatro antígenos pesquisados, os respectivos anticorpos primários foram testados em diferentes títulos conforme a seguir:
- anti-MLH1: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800;
 - anti-MSH2: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800 e 1/1600;
 - anti-MSH6: 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 e 1/800;
 - anti-PMS2: 1/50, 1/100, 1/250, 1/500 e 1/1000.
- c) Sistema de revelação: foi utilizado o sistema de revelação baseado em polímeros curtos: (Novocastra, Newcastle, Reino Unido).

Apresentam-se a seguir as condições ótimas padronizadas para os quatro anticorpos alvos do presente estudo (Quadro 1).

Quadro 1. Distribuição dos Anticorpos utilizados nas reações de IHC, técnicas de recuperação antigênica, titulação e método de revelação das reações

Anticorpo	Clone	RA	Título	Revelação
anti-MLH1	G168-15	-panela vapor -pH=6,0	1:100	NovoLink
anti-MSH2	G2019-1129	-panela vapor -pH=6,0	1:800	NovoLink
anti-MSH6	44\MSH6	-panela vapor -pH=6,0	1:100	NovoLink
anti-PMS2	A16-4	-panela vapor -pH=6,0	1:1000	NovoLink

Procedeu-se, dessa forma, aos ensaios imuno-histoquímicos conforme etapas discriminadas a seguir:

1. Desparafinização dos cortes de 3 μ de espessura, do material incluído em parafina: incubação com xilol a 60^o C por 15 minutos, seguido por outra incubação com xilol à temperatura ambiente por 15 minutos;
2. Hidratação dos cortes em concentrações de Etanol a 100% com três banhos de 30 segundos cada, Etanol a 95%, 80% e 70% por 30 segundos, lavagem em água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica mediante incubação das lâminas em solução de TRIS 10 mM e EDTA 1 mM, pH 9,0 em panela a vapor; após a fervura da água da panela, colocado a cuba com as lâminas em solução de recuperação, por 40 minutos. Deixado esfriar por 20 minutos à temperatura ambiente. Lavagens em água corrente e água destilada;
4. Bloqueio da peroxidase endógena com água oxigenada (H₂O₂) a 6% diluída v/v em metanol, em três banhos de 10 minutos cada.

Lavagens em água corrente e água destilada.

Lavagem com solução salina tamponada com fosfatos (PBS) 10 mM pH 7,4 por 5 minutos.
5. Bloqueio de proteínas com Cas Block (Zymed) por 10 minutos a 37^o C. Escorrido e incubado com o anticorpo primário.
6. Incubação das lâminas com anticorpo primário (específico para o antígeno) diluído em solução de albumina bovina (BSA) (SIGMA,

E.U.A.) a 1,0% e azida sódica NaN_3 (Inlab, São Paulo) 0,1% em PBS, em câmara úmida: 30 min. a 37°C e, em seguida, 18 horas (overnight) a 4°C.

Lavagens em tampão PBS com três trocas de 5 minutos cada.

7. Incubação com o bloqueador pós-primário (Post Primary Block, NovoLink Max Polymer Detection System, Newcastle, Reino Unido), por 30 minutos a 37°C.

Lavagens com tampão PBS com três trocas de 3 a 5 minutos cada.

8. Incubação com NovoLink (Polímero) do mesmo kit por 30 minutos a 37°C.
9. Revelação com solução de substrato cromogênico contendo diaminobenzidina (Sigma, E.U.A.) a 0,10%, peróxido de hidrogênio a 0,06%, dimetil sulfoxido (Labsynth) a 1% em PBS, em banho de 5 minutos, a 37°C.

Lavagens em água corrente e água destilada.

10. Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto, lavagens em água corrente e água destilada. Imersão rápida em água amoniacal (solução de hidróxido de amônia 0,5%) seguido de lavagens em água corrente e água destilada.
11. Desidratação dos cortes em banhos de etanol a 50%, 80%, 95% e etanol absoluto (três trocas de 1 minuto cada), diafanização em banhos de xilol (quatro trocas de 1 minuto cada) e montagem em meio permanente (Entellan Merck) com lamínula.

4.5.2 Controles positivos e negativos usados durante os ensaios imuno-histoquímicos

Os controles utilizados na reação imuno-histoquímica compreenderam, um controle positivo, caracterizado por adenocarcinoma colorretal, previamente corado e sabidamente positivo para o anticorpo em estudo, e um controle negativo com incubação em PBS e eliminação do anticorpo primário.

4.5.3 Interpretação dos resultados das reações imuno-histoquímicas

As reações imuno-histoquímicas foram qualitativamente interpretadas como positivas ou negativas nas amostras dos tumores primários representados nos cortes histológicos obtidas dos blocos de parafina.

Resultado positivo (não alterado) foi assinalado para as amostras em que foi identificada real positividade nuclear nas células tumorais, interpretada de acordo com os controles internos positivos, correspondentes a linfócitos, células estromais ou células epiteliais glandulares colônicas não neoplásicas. É importante salientar que até mesmo fraca reatividade nuclear nas células tumorais, tendo em vista, também, fraca reatividade nos controles internos anteriormente mencionados, foi considerada positiva.

O resultado negativo (alterado) foi assinalado para as amostras em que foi identificada real negatividade nuclear nas células tumorais, interpretada de acordo com os controles internos positivos, correspondentes a linfócitos, células estromais ou células epiteliais glandulares colônicas não neoplásicas.

É importante mencionar que a negatividade somente foi considerada nos casos sem qualquer marcação nuclear, com controles internos, previamente listados, positivos.

4.6 Instabilidade de Microssatélites (MSI)

Os procedimentos de MSI foram realizados, no Hospital A. C. Camargo (Laboratório de Patologia Molecular Diagnóstica, Laboratório de Genômica e Biologia Molecular).

Quadro 2. Pesquisa da MSI

MATERIAL	TÉCNICAS	INTERPRETAÇÃO
Amostra de tecido tumoral (em formol ou parafina) e tecido normal	Determinação no número de repetições dos microssatélites BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27, PENTA C, PENTA D	O número de repetições dos microssatélites no tecido tumoral deve ser igual ao tecido normal

4.6.1 Sistema de Análise MSI

Foram utilizadas sondas (*primers*) marcadas com fluorescência para amplificação de sete marcadores, incluindo cinco marcadores mononucleotídeos repetidos (BAT-25, BAT-26, NR-21, NR-24 e MONO-27) e dois marcadores pentanucleotídeos repetidos (Penta C e Penta D). Os marcadores mononucleotídeos foram usados para a determinação da MSI e os marcadores pentanucleotídeos foram usados para controle da reação. Os produtos da PCR foram separados por eletroforese capilar.

4.6.2 Protocolo de extração

Cortaram-se um a dois cilindros do material parafinado direto no tubo de 1,5 ml.

Desparafinização

1. Adicionou-se 1ml de xilol. Agitou-se por inversão. Incubou-se por 5 minutos a 57°C.
2. Removeu-se o sobrenadante com a pipeta. Descartou-se o xilol em lixo apropriado.
3. Adicionou-se 1ml de xilol. Agitou-se por inversão. Removeu-se bem o sobrenadante com a pipeta.
4. Adicionou-se 1ml ETOH (etanol) 100% à amostra. Homogeneizou-se por inversão.
5. Removeu-se o sobrenadante com a pipeta. Repetiu-se o procedimento com ETOH 100% mais 2x.
6. Removeu-se o excesso de etanol com a pipeta e secou-se na estufa a 42°C por, aproximadamente, 2min ou até perceber-se que evaporou todo etanol.

Digestão e Purificação do DNA

1. Adicionou-se 600µl de Cell Lysis Solution (Gentra Puregene Blood Kit-Qiagen-Cat nº1589080) no pellet gerado no passo 6.
2. Incubou-se a 55°C em agitação (300 rpm) por 18 horas.

3. Adicionou-se mais 10-15µl de Proteinase K, caso o tecido não tenha dissolvido por completo.
4. Centrifugou-se o tubo Phase Lock Gel (PGL) por 1 min a 13.200 rpm.
5. Transferiu-se a amostra para o tubo PLG. Adicionou-se 500µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico.
6. Homogeneizou-se por inversão por 1 min. Centrifugou-se por 10 min. a 13.200 rpm.
7. Transferiu-se a fase aquosa (acima da resina do tubo) para um novo tubo PLG. Adicionou-se 500 µl de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1). Homogeneizou-se. Centrifugou-se por 10 min. a 13.200.
8. Adicionou-se 400 µl de clorofórmio direto no tubo PLG (sem trocar de tubo).
9. Homogeneizou-se por inversão por 1 min.
10. Centrifugou-se por 10 min. a 13.200 rpm.
11. Transferiu-se a fase aquosa para um novo tubo (2,0 ml) e adicionou-se 0,5 µl de glicogênio (20µg/µl) e 800µl de ETOH 100% gelado. Homogeneizou-se bem por inversão.
12. Incubou-se por 1 hora a -20°C (se a nuvem de DNA estivesse evidente pulou-se esse passo).
13. Centrifugou-se por 30 min. a 14.000 rpm a 4°C. Removeu-se o sobrenadante.

14. Lavou-se o pellet 3x com 1ml de ETOH 70% gelado. Descolou-se o pellet do fundo do tubo na primeira lavagem. Centrifugou-se por 2 min. a 14.000 rpm a 4°C.
15. Removeu-se o etanol (retirou-se o excesso com a pipeta). Secou-se o pellet a 42°C ou na bancada.
16. Ressuspendeu-se em -20µl de H₂O
17. Incubou-se a 55°C por 10 minutos.
18. Deixou-se overnight a 4°C.
20. Armazenou-se em freezer -20°C.

4.6.3 Amplificação

Componente volume por amostra

Água livre de nuclease: 5,85µl

Tampão Gold Star 10x: 1,00µl

Sistema de Análise MSI mistura de pares de primers 10x: 1,00µl

AmpiTaq Gold DNA polymerase (5u/µl): 0,15µl

Foram utilizados 100ng de DNA ciclagem.

4.6.4 Perfil da ciclagem

95°C por 11 minutos, depois:

96°C por 1 minutos, depois:

Rampa 100% a 94°C por 30 segundos

Rampa 29% a 58°C por 30 segundos

Rampa 23% a 70°C por 1 minuto, por 10 ciclos, depois:

Rampa 100% a 90°C por 30 segundos,

Rampa 29% a 58°C por 30 segundos,

Rampa 23% a 70°C por 1 minuto,

Por 20 ciclos, em seguida:

60°C por 30 minutos

4°C embeber

4.6.5 Preparação da amostra

As amostras foram analisadas no sequenciador ABI 3500 (oito capilares de Applied Biosystems).

O padrão *Size Standard* 600 foi incluído em cada experimento para padronização das amostras de análise de amplificação e utilizou-se da quarta cor.

1. Preparou-se um coquetel pesado pela combinação e mistura do padrão 600 (ILS 600) e formamida deionizado como segue: [(1,0µl ILS 600) + (24µl formamido deionizado) x (# injeções)].
2. Combinou-se 25µl do coquetel preparado e 1µl da amostra amplificada.
3. Desnaturaram-se as amostras a 95°C por 3 minutos e banho de gelo triturado por 3 minutos.

4.7 Análise da mutação somática para o BRAF

4.7.1 Técnica

Pesquisa da mutação 1799 T>A (V600E) no exon 15 do gene BRAF. O DNA genômico foi extraído do tecido emblocado em parafina com kits apropriados e recuperado em solução tampão adequada. A PCR, para posterior sequenciamento, foi realizada utilizando par de oligonucleotídeos específicos para a região de interesse. Antes do sequenciamento, os produtos da PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose para verificação do sucesso da amplificação.

4.7.2 Interpretação

- (1) Positivo: O caso considerado POSITIVO apresenta o nucleotídeo A na posição 1799;
- (2) Negativo: O caso considerado NEGATIVO apresenta o nucleotídeo T na posição 1799.

Sequenciamento do DNA (método de Sanger) (Figura 1)

O sequenciamento de DNA (método de Sanger) foi realizado no aparelho ABI PRISM™ 3130 (*Applied Biosystems*) utilizando *Big dye terminator v3.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems)*, conforme recomendações do fabricante ⁽¹⁰⁷⁾.

Figura 1. Representação da análise da mutação V600E (1799 T>A) do gene BRAF. No eletroferograma do sequenciamento está destacado um exemplo de selvagem (A) e de mutação em heterozigose (B).

4.8 Análise Estatística

1. ANÁLISE DESCRITIVA

- Realizada através de percentuais para variáveis qualitativas e para as variáveis numéricas utilizamos média $\pm$ desvio padrão (DP).

2. TESTES ESTATÍSTICOS

- Teste Exato de Fisher- Para verificar a associação entre as variáveis.

- Teste t de Student (quantitativo) / Mann-Whitney- Para comparar as médias/medianas de idade entre os grupos.
- Regressão Logística Binária Simples- Para avaliar quais fatores foram preditores da positividade das variáveis de interesse (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2 e MSI), dando a razão de chance e os respectivos intervalos de confiança de 95%.
- Regressão Logística Binária Múltipla- Dentre todos os fatores, quais mais se associam com a imuno-histoquímica e a instabilidade de microssatélites.

3. ESCORE

- Realizou-se regressão logística simples. Fatores que tiveram p valores $<0,20$ foram escolhidos para serem avaliados na regressão logística múltipla e em que as variáveis mais importantes foram escolhidas pelo critério AIC (Akaike Information Criterion)¹⁴⁵. Definiu-se o escore a partir do preditor linear e os coeficientes foram reescalados de forma que o escore estivesse entre 0 e 100. Encontrou-se o ponto de corte (43,63) a partir da curva ROC (Receiver Operating Characteristic), através da maximização do índice de Youden⁽¹⁴⁴⁾. Calcularam-se: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo. Por fim, avaliou-se o otimismo da validação interna através de amostras bootstrap⁽¹⁴³⁾.

5 RESULTADOS

5.1 Critérios de Amsterdam I e Bethesda Revisados

Após a aplicação do questionário de avaliação da história familiar, 61 dos 118 pacientes estudados (52%), preencheram pelo menos um dos critérios de Bethesda revisados para Síndrome de Lynch (SL). Destes 61 casos estudados, 36 eram do sexo feminino (59%) e 25 do sexo masculino (41%), com idade variando de 22 a 87 anos (média: 53,18, DP= 16,5). Nove pacientes apresentaram todos os critérios de Amsterdam I presentes. Todos pacientes apresentaram pelo menos um critério de Bethesda revisado. O critério 5 de Bethesda revisado foi o mais encontrado nesta casuística, seguidos pelos critérios 1, 3, 4 e 2 (Anexo IV). Pelo menos um critério de Bethesda revisado estava presente em 26 pacientes e dois ou mais critérios em 35 pacientes, como visto na tabela 1.

Tabela 1. Frequência dos critérios clínicos para a Síndrome de Lynch

Crítérios	Número de casos
Amsterdam I	9 (14,7)
Bethesda revisado 1	29 (47,5)
Bethesda revisado 2	2 (4,92)
Bethesda revisado 3	24 (39,3)
Bethesda revisado 4	14 (22,9)
Bethesda revisado 5	43 (70,5)
Pelo menos um critério de Bethesda revisado	26 (42,6)
Dois ou mais critérios de Bethesda revisados	35 (57,4)
Bethesda revisados	61

5.2 Localização do tumor

Dez tumores estavam localizados no cólon direito (16%) e 52 no cólon esquerdo (84%). Um paciente apresentou tumores sincrônicos, um no cólon direito e o outro no cólon esquerdo. Neste caso, apenas o tumor do cólon esquerdo foi avaliado na histologia, imuno-histoquímica e MSI, por falta de material disponível.

Tabela 2. Localização dos tumores

Localização do tumor	Número/%
Cólon direito	10 (16%)
Cólon esquerdo	52 (84%)

5.3 Histopatologia

A histopatologia foi considerada positiva quando presente pelo menos uma das características histopatológicas da Síndrome de Lynch (72%).

Tabela 3. Histopatologia positiva e negativa

Histopatologia	Número/%
Histopatologia positiva	44 (72%)
Histopatologia negativa	17 (28%)
Total	61 (100%)

Os linfócitos intratumor, a característica expansiva do tumor e o componente mucinoso foram os achados histopatológicos mais encontrados na avaliação destes tumores, como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Componentes histopatológicos avaliados em 61 pacientes com história familiar e pelo menos um critério de Bethesda revisado

Componentes Histopatológicos	Número
Componente mucinoso	17
Componente sinete	8
Componente medular	1
Linfócitos intratumor	29
Reação crohn-like	9
Expansivo	18

Figura 2. Carcinoma pouco diferenciado apresentando padrão medular. Padrão expansivo de crescimento (HEX100)

Figura 3. Carcinoma sólido pouco diferenciado padrão medular (HEX400)

Figura 4. Carcinoma sólido pouco diferenciado apresentando padrão medular (HEX100)

Figura 5. Folículo linfoide com exuberante centro germinativo (HEX100)

5.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica estava alterada (não expressão das proteínas de reparo) em oito casos (13%) e não alterada em 53 casos (87%).

Tabela 5. Resultado da avaliação Imuno-histoquímica em 61 pacientes com história familiar e pelo menos um critério de Bethesda revisado

Imuno-histoquímica	Número/%
Alterada	8 (13%)
Não alterada	53 (87%)
Total	61 (100%)

Destes, cinco casos apresentaram positividade para os dímeros MSH2/MSH6. A positividade para os dímeros MLH1/PMS2 ocorreu em três casos.

Figura 6. MLH1 alterado na neoplasia. Diversos linfócitos reativos servem como controle positivo (Imuno-histoquímicaX200)

Figura 7. MLH1 alterado na neoplasia. Diversos linfócitos reativos servem como controle positivo (ImunoperoxidaseX400)

Figura 8. PMS2 positivo. Negativo para células neoplásicas. Diversos linfócitos com núcleos reativos servem como controle positivo (X100)

Figura 9. MSH2 positivo nos núcleos das células neoplásicas e nas células do estroma (X200)

Figura 10. MSH6 positivo nas células neoplásicas e nas células do estroma (X100)

5.5 Instabilidade de Microssatélites

A instabilidade dos microssatélites (MSI) foi testada nos 61 casos, destes, 12 casos (20%) apresentaram testes positivos e 49 negativos (80%). Dos 12 casos positivos, 11 foram classificados como MSI-H (dois ou mais marcadores instáveis) e um MSI-L (um marcador instável).

Tabela 6. MSI positiva e negativa

MSI	Número
MSI positiva	12 (20%)
MSI negativa	49 (80%)
Total	61

5.6 Análise da mutação somática para BRAF

O sequenciamento do gene BRAF não demonstrou mutação nos 12 casos positivos para MSI. Afastou-se, portanto, a hipermetilação na região promotora do gene MLH1.

Tabela 7. Distribuição dos resultados da IHC, MSI e BRAF nos 12 pacientes alterados

Casos	BAT25	BAT26	NR21	NR24	Mono27	Penta C	Penta D	IHC	BRAF
14	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Alterada	Neg
15	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Alterada	Neg
22	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Alterada	Neg
31	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Alterada	Neg
33	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Alterada	Neg
42	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	Alterada	Neg
50	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Alterada	Neg
58	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Alterada	Neg
26	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	Não alt.	Neg
32	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	Não alt.	Neg
40	Não	Não	Inc.	Não	Não	Sim	Sim	Não alt.	Neg
60	Inc.	Inc.	Sim	Sim	Inc.	Inc.	Sim	Não alt.	Neg

SIM = Marcador instável, NÃO = Marcador estável, Inconclusivo = Não foi possível definir. Classificação: MSI-L = 1 marcador instável, MSI-H = 2 ou mais marcadores instáveis (segundo classificação de Bethesda: MSI-H $\geq$ 30% marcadores instáveis), BRAF: POSITIVO apresenta o nucleotídeo A na posição 1799; NEGATIVO apresenta o nucleotídeo T na posição 1799.

5.7 Associações entre as variáveis estudadas

5.7.1 IHC

Localização tumoral

Em 10/44 casos com critérios histopatológicos de Síndrome de Lynch os tumores ocorreram no cólon direito. Todos os casos que não tinham estes critérios estavam localizados no cólon esquerdo, ($p=0,051$).

Nos 17 casos com histopatologia negativas, em 100% dos casos as lesões estavam localizadas no cólon esquerdo. Em apenas um paciente que apresentou lesões sincrônicas, este mostrou uma lesão no cólon direito e outra no cólon esquerdo. A lesão do cólon direito não foi avaliada por falta de material disponível para análise.

Tabela 8. Histopatologia negativa e localização do tumor

Histopatologia		Localização	Número	Valor P
Negativa	17	Cólon esquerdo	17	0,05
		Cólon direito	0	
Positiva	44	Cólon esquerdo	34	
		Cólon direito	10	

Teste Exato de Fisher

Três dos oito (37,5%) pacientes com imuno-histoquímica alterada tinham localização tumoral no cólon direito e seis dos 53 (12,8%) pacientes com imuno-histoquímica não alterada também apresentaram localização tumoral à direita, ($p=0,013$).

Tabela 9. Associação entre a IHC e a localização dos tumores colorretais

IHC	Cólon direito	Cólon esquerdo	Total	Valor P
Alterada	3	5	8	0,013
Não alterada	6	47	53	

Teste Exato de Fisher

Critérios Clínicos

Houve uma variação de dois (50%) até quatro (12,5%) critérios de Bethesda revisados presentes, quando a imuno-histoquímica apresentava resultado alterado. Em nenhum caso, foi encontrado apenas um critério de Bethesda revisado, quando a imuno-histoquímica era alterada.

Tabela 10. Critérios de Bethesda revisados e imuno-histoquímica alterada

Critérios de Bethesda revisados	Imuno-histoquímica alterada
Pelo menos um	0 (0%)
Dois	4 (50%)
Três	3 (37,5%)
Quatro	1 (12,5%)
Total	8 (13%)

Dois critérios de Bethesda revisados ocorreram em três casos (60%), três em um (20%) e quatro em um caso (20%), nos pacientes com dímeros MSH2/MSH6 positivos. Nos pacientes com dímeros MLH1/PMS2 positivos, dois apresentaram três critérios de Bethesda revisados (67%) e um (33%), dois critérios de Bethesda revisados presentes.

Tabela 11. Dímeros positivos e Critérios de Bethesda revisados

Critérios de Bethesda revisados	MSH2/MSH6
Pelo menos um	0 (0%)
Dois	3 (60%)
Três	1 (20%)
Quatro	1 (20%)
Total	5 (62,5%)
Critérios de Bethesda revisados	MLH1/PMS2
Pelo menos um	0 (0%)
Dois	1 (33%)
Três	2 (67%)
Total	3 (37,5%)

Dentre os pacientes com somente um critério de Bethesda revisado, nenhum teve alteração na imuno-histoquímica, enquanto os pacientes com mais de um critério de Bethesda revisado, 22,86%, apresentavam alterações na imuno-histoquímica ($p=0,016$).

Histopatologia

Quando comparamos os dados histopatológicos dos pacientes com imuno-histoquímica alterada (13%), três pacientes apresentaram quatro critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch (37,5%), um com três critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch (12,5%), dois com dois critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch (25%), um com um critério histopatológico para a Síndrome de Lynch (12,5%). Apenas um paciente, apresentou histopatologia negativa (12,5%), quando a imuno-histoquímica estava alterada. As Tabelas 12 e 13 mostram a disposição dos critérios histopatológicos na imuno-histoquímica alterada e não alterada.

Tabela 12. Critérios histopatológicos na imuno-histoquímica alterada

Critérios Histopatológicos	Imuno-histoquímica alterada
Histopatologia negativa	1 (12,5%)
Um critério histopatológico	1 (12,5%)
Dois critérios histopatológicos	2 (25%)
Três critérios histopatológicos	1 (12,5%)
Quatro critérios histopatológicos	3 (37,5%)
Total	8 (13%)
Critérios Histopatológicos	MSH2/MSH6
Histopatologia negativa	1 (20%)
Um critério histopatológico	0 (0%)
Dois critérios histopatológicos	2 (40%)
Três critérios histopatológicos	1 (20%)
Quatro critérios histopatológicos	1 (20%)
Total	5 (62,5%)
Critérios Histopatológicos	MLH1/PMS2
Histopatologia negativa	0 (0%)
Um critério histopatológico	1 (33%)
Dois critérios histopatológicos	0 (0%)
Três critérios histopatológicos	0 (0%)
Quatro critérios histopatológicos	2 (67%)
Total	3 (37,5%)

Tabela 13. Critérios histopatológicos na imuno-histoquímica não alterada

Critérios histopatológicos	Imuno-histoquímica não alterada
Histopatologia negativa	16 (30%)
Um critério histopatológico	21 (40%)
Dois critérios histopatológicos	8 (15%)
Três critérios histopatológicos	7 (13%)
Quatro critérios histopatológicos	1 (2%)
Total	53 (87%)

A concordância entre histopatologia positiva e imuno-histoquímica alterada ocorreu em sete casos. A histopatologia foi negativa em apenas um caso com imuno-histoquímica alterada.

A imuno-histoquímica não alterada ocorreu em 53 casos, destes, 16 (30%) tinham histopatologia negativa para a Síndrome de Lynch, 21 pacientes (40%) apresentaram apenas um critério histopatológico para a Síndrome de Lynch, oito apresentaram dois critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch, sete (13%) apresentaram três critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch e um (2%) apresentou quatro critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch.

Tabela 14. Distribuição dos 61 pacientes de acordo com os achados imuno-histoquímicos e as variáveis clínico-patológicas.

	Imuno-histoquímica		valor de p
	Não Alterada	Alterada	
Componente Histopatológico: Presente	37 (69,81)	7 (87,5)	0,423
Número de Componentes Histopatológico: 0	16 (30,19)	1 (12,5)	0,01
1	21 (39,62)	1 (12,5)	
2	8 (15,09)	2 (25)	
3	7 (13,21)	1 (12,5)	
4	1 (1,89)	3 (37,5)	
Componente Mucinoso	12 (22,64)	5 (62,5)	0,032
Componente Sinete	6 (11,32)	2 (25)	0,28
Componente Medular	1 (1,89)	0 (0)	1
Linfócitos Intratumor	22 (41,51)	7 (87,5)	0,022
Reação Crohn-Like	6 (11,32)	3 (37,5)	0,087
Expansivo	15 (28,3)	3 (37,5)	0,683
Localização: cólon direito	4 (8,16)	5 (41,67)	0,013
Bethesda revisado 1	24 (45,28)	5 (62,5)	0,46
Bethesda revisado 2	2 (3,77)	1 (12,5)	0,349
Bethesda revisado 3	18 (33,96)	6 (75)	0,048
Bethesda revisado 4	9 (16,98)	5 (62,5)	0,012
Bethesda revisado 5	38 (71,7)	5 (62,5)	0,683
Bethesda revisado > 1	27 (50,94)	8 (100)	0,016
Amsterdam I	4 (7,55)	5 (62,5)	0,001

Teste Exato de Fisher

5.7.2 MSI

Localização do tumor

A MSI estava presente em doze casos (20%), nos oito casos com imuno-histoquímica alterada e MSI presente, quatro estavam localizados no cólon direito e quatro casos no cólon esquerdo.

Nos quatro casos com MSI presente e imuno-histoquímica não alterada, todos os pacientes apresentaram idade superior aos 60 anos (63, 64, 69 e 70 anos), três com tumores localizados no cólon esquerdo e um no cólon direito. Em apenas um caso, a MSI era MSI-L, nas três restantes a MSI era MSI-H.

Critérios Clínicos

Quando a MSI foi positiva, dois pacientes apresentaram pelo menos um critério de Bethesda revisado, seis com dois critérios, três com três critérios e um com quatro.

Tabela 15. MSI positivo e critérios de Bethesda revisados

Critérios de Bethesda revisados	MSI Positivo
Pelo menos um critério	2 (17%)
Dois critérios	6 (50%)
Três critérios	3 (25%)
Quatro critérios	1 (8%)
Total	12 (20%)

Histopatologia

Nos 12 casos positivos para MSI, três pacientes apresentaram quatro critérios histopatológicos presentes para a Síndrome de Lynch (25%), dois com três critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch (16,7%), três com dois critérios histopatológicos presentes para a Síndrome de Lynch (25%), dois com um critério histopatológico presente para a Síndrome de Lynch (16,7%) e dois

com histopatologia negativa (16,7%). A histopatologia foi positiva em dez pacientes (83%), com MSI presente, e negativa em dois casos (17%).

Tabela 16. MSI positivo e histopatologia

Critérios histopatológicos	MSI positivo
Histopatologia negativa	2 (16,7%)
Pelo menos um critério	2 (16,7%)
Dois critérios	3 (25%)
Três critérios	2 (16,7%)
Quatro critérios	3 (25%)
Total	12 (20%)

Tabela 17. Distribuição dos 61 pacientes de acordo com os achados de MSI (confirmados pela análise do BRAF) e as variáveis clínico-patológicas.

	MSI		valor de p
	Não Alterado	Alterado	
Componente Histopatológico: Presente	34 (69,39)	10 (83,33)	0,481
Número de Componentes Histopatológico: 0	15 (30,61)	2 (16,67)	0,034
1	20 (40,82)	2 (16,67)	
2	7 (14,29)	3 (25)	
3	6 (12,24)	2 (16,67)	
4	1 (2,04)	3 (25)	
Componente Mucinoso	12 (24,49)	5 (41,67)	0,287
Componente Sinete	6 (12,24)	2 (16,67)	0,65
Componente Medular	0 (0)	1 (8,33)	0,197
Linfócitos Intratumor	19 (38,78)	10 (83,33)	0,009
Reação Crohn-Like	6 (12,24)	3 (25)	0,361
Expansivo	13 (26,53)	5 (41,67)	0,313
Localização: cólon direito	5 (9,43)	4 (50)	0,011
Bethesda revisado 1	24 (48,98)	5 (41,67)	0,753
Bethesda revisado 2	2 (4,08)	1 (8,33)	0,488
Bethesda revisado 3	18 (36,73)	6 (50)	0,513
Bethesda revisado 4	7 (14,29)	7 (58,33)	0,003
Bethesda revisado 5	34 (69,39)	9 (75)	1
Bethesda revisado > 1	25 (51,02)	10 (83,33)	0,001
Amsterdam I	3 (6,12)	6 (50)	0,055

Teste Exato de Fisher

5.8 Critérios de Amsterdam

A concordância entre histopatologia positiva e Amsterdam I presente ocorreu em sete casos estudados. A histopatologia foi negativa em dois casos, que apresentaram critérios de Amsterdam I positivos.

Tabela 18. Amsterdam I positivo, histopatologia positiva e negativa, imuno-histoquímica alterada e não alterada e MSI positiva e negativa

Amsterdam positivo	I	Histopatologia positiva	MSI positiva	Imuno-histoquímica alterada
9		7	5	5
14,75% TOTAL		77,77%	55,55%	55,55%
Amsterdam positivo	I	Histopatologia negativa	MSI negativa	Imuno-histoquímica não alterada
9		2	4	4
14,75% TOTAL		22,22%	44,44%	44,44%

A imuno-histoquímica (IHC) estava alterada em cinco casos (55,55%) e não alterada em quatro, nos casos com Amsterdam I presente. A instabilidade de microssatélites (MSI) estava presente em cinco casos e ausente em quatro casos com Amsterdam I presente. Houve associação com os resultados da IHC e da MSI quando os critérios de Amsterdam I estavam presentes.

5.9 Testes de associação, Regressão binária simples e Regressão binária múltipla

Testes de Associação

Os testes de associação mostraram associação dos Critérios de Amsterdam I com a instabilidade dos microssatélites e com o MLH1 e PMS2, na imuno-histoquímica. Já com os critérios de Bethesda revisados, houve associação com o sexo masculino, componente mucinoso, linfócitos intratumor e reação Crohn's like na histopatologia. Houve também, associação destes critérios com o MLH1 e PMS2, na imuno-histoquímica e entre a instabilidade dos microssatélites.

Quadro 3. Avaliação dos critérios clínicos quanto à associação com as variáveis clínico-patológica em 61 pacientes

Critério clínico	Variável clínico-patológica	Valor p
Amsterdam I	Sexo	0,467
Amsterdam I	Componente Mucinoso	0,699
Amsterdam I	Componente Sinete	0,591
Amsterdam I	Componente Medular	1
Amsterdam I	Linfócitos Intratumor	0,287
Amsterdam I	Reação Crohn's-Like	0,12
Amsterdam I	Expansivo	0,108
Amsterdam I	MSI (presente)	0
Amsterdam I	MSH2	0,154
Amsterdam I	MLH1 (alterado)	0,002
Amsterdam I	MSH6	0,154
Amsterdam I	PMS2 (alterado)	0,002
Amsterdam I	Localização	0,609
Bethesda revisados	Sexo (masculino)	0,007
Bethesda revisados	Componente Mucinoso	0,009
Bethesda revisados	Componente Sinete	0,4
Bethesda revisados	Componente Medular	0,574
Bethesda revisados	Linfócitos Intratumor	0,08
Bethesda revisados	Reação Crohn's-Like	0,001
Bethesda revisados	Expansivo	0,771
Bethesda revisados	MSI (presente)	0,051
Bethesda revisados	MSH2	0,091
Bethesda revisados	MLH1 (alterado)	0,016
Bethesda revisados	MSH6	0,091
Bethesda revisados	PMS2 (alterado)	0,016
Bethesda revisados	Localização	0,123

Teste Exato de Fisher

REGRESSÃO BINÁRIA SIMPLES E MÚLTIPLA

Na regressão binária simples com a instabilidade de microssatélites (MSI), se o indivíduo tiver o critério de Bethesda revisado quatro (B4), então a chance dele apresentar MSI positiva na população estudada é de 8,4. A regressão binária múltipla mostrou que dentre todos os critérios de Bethesda revisado, o mais informativo sobre a MSI é o B4, com uma chance de 10,59 do indivíduo que apresenta este critério ter MSI presente.

Tabela 19. Regressão Binária Simples (MSI)

Fatores	Grupo	RC	IC 95%		Valor de p
Sexo	Masculino	2,41	0,67	8,72	0,18
Bethesda.1	Presente	0,74	0,21	2,67	0,65
Bethesda.2	Presente	2,14	0,18	25,74	0,55
Bethesda.3	Presente	1,72	0,48	6,15	0,402
Bethesda.4	Presente	8,4	2,07	34,04	0,003
Bethesda.5	Presente	1,32	0,31	5,59	0,703
Componente Mucinoso	Presente	2,2	0,59	8,24	0,241
Componente Sinete	Presente	1,43	0,25	8,19	0,685
Componente Medular	Presente	-	-	-	0,197
Linfócitos Intratumor	Presente	7,89	1,56	40	0,013
Reação Crohn-Like	Presente	2,39	0,5	11,37	0,274
Expansivo	Presente	1,98	0,53	7,34	0,308
Localização	Colón Direito	8,33	1,72	33,33	0,008
Amsterdam I	Presente	15,33	3,01	78,01	0,001
Bethesda revisados	> 1	4,8	0,95	24,24	0,057
Componente.Histopatológico	Positivo	2,21	0,43	11,31	0,343
N.Componente.Histopatológico	1	0,75	0,09	5,95	0,785
N.Componente.Histopatológico	> 1	4,28	0,77	23,76	0,096

Tabela 20. Regressão Binária Simples (IHC)

Fatores	Grupo	RC	IC 95%		Valor de p
Sexo	M	5,37	0,99	29,27	0,052
Bethesda.1	Presente	2,01	0,44	9,31	0,37
Bethesda.2	Presente	3,64	0,29	45,58	0,316
Bethesda.3	Presente	5,84	1,07	31,86	0,042
Bethesda.4	Presente	8,15	1,64	40,42	0,01
Bethesda.5	Presente	0,66	0,14	3,1	0,597
Componente Mucinoso	Presente	5,69	1,18	27,36	0,03
Componente Sinete	Presente	2,61	0,43	15,98	0,299
Componente Medular	Presente	0	0	Inf	0,995
Linfócitos Intratumor	Presente	9,87	1,13	86,04	0,038
Reação Crohn-Like	Presente	4,7	0,89	24,83	0,068
Expansivo	Presente	1,52	0,32	7,17	0,597
Localização	Cólon Direito	10	1,81	50	0,008
Amsterdam I	Presente	20,41	3,52	118,41	0,001
Bethesda revisados	> 1	-	-	-	0,016
Componente.Histopatológico	Positivo	3,03	0,34	26,67	0,318
N.Componente.Histopatológico	1	0,76	0,04	13,14	0,851
N.Componente.Histopatológico	> 1	6	0,65	55,73	0,115

Tabela 21. Regressão Logística Binária Múltipla (MSI)

Variável	RC		IC 95%		Valor de p
Bethesda.1Presente	0,68	0,05	8,65		0,764
Bethesda.2Presente	1,03	0,06	18,38		0,984
Bethesda.3Presente	4,31	0,42	44,36		0,221
Bethesda.4Presente	10,59	2,04	54,95		0,005
Bethesda.5Presente	1,67	0,26	10,72		0,588

5.10 Escore

Baseado nos dados obtidos com a realização desta pesquisa (através da regressão logística binária múltipla, segundo AIC), foi proposto um escore para caracterizar pacientes com Síndrome de Lynch.

ESCORE PARA IHC

Figura 11. Curva ROC para IHC

Se o escore for > 49,4%

Sensibilidade (Se): foi 88% (47% até 100%)

Especificidade (Sp): foi 89% (77% até 96%)

Valor preditivo positivo (PPV): 54% (33% até 98%)

Valor preditivo negativo (NPV): 98% (86 até 99%)

Quadro 4. Escore para IHC

	Escore				Estimativa
	Estimativa	IC 95%		Otimismo	
Ponto de corte	49.4	NA	NA		
Se	0,88	0,47	1	-0,057	0,823
Sp	0,89	0,77	0,96	-0,073	0,817
PPV	0,54	0,33	0,98	-0,166	0,374
NPV	0,98	0,86	0,99	-0,009	0,971
DLR.Positive	7.73	3.48	17.16		
DLR.Negative	0.14	0.02	0.88		

Escore = 17,69 + 14,75 Bethesda 4 Presente + 22,41 Componente mucinoso Presente + 15,25 Linfócitos Intratumor Presente + 17,69 Localização Cólon Direito + 29,88 Amsterdam I Presente

ESCORE PARA MSI

Figura 12. Curva ROC para MSI

Se o escore for > 43,63%

Sensibilidade (Se): foi 83% (52% até 98%)

Especificidade (Sp): foi 88% (75% até 95%)

Valor preditivo positivo (VPP): 62% (41% até 94%)

Valor preditivo negativo (VPN): 96% (82% até 98%)

Quadro 5. Escore para MSI

	Escore				
	Estimativa	IC 95%			
Ponto de corte	43.63			Otimismo	Estimativa
Se	0,83	0,52	0,98	-0,03	0,80
Sp	0,88	0,75	0,95	-0,04	0,84
PPV	0,62	0,41	0,94	-0,11	0,51
NPV	0,96	0,82	0,98	-0,01	0,95
DLR.Positive	6.81	3.09	15.01		
DLR.Negative	0.19	0.05	0.68		

Escore = 26,72 + 20,95 Bethesda 4 Presente + 22,68 Linfócitos Intratumor Presente + 26,72 Localização Cólon Direito + 29,64 Amsterdam I Presente

6 DISCUSSÃO

Dos 458 casos de CCR, 26% apresentaram histórico familiar, 13% preencheram os critérios de Bethesda revisados e 2,62% apresentaram MSI presente. A frequência de Síndrome de Lynch nos pacientes submetidos à ressecção por câncer e com história familiar foi de 20%. Estes resultados são compatíveis aos da Literatura^(54-55,99).

Os resultados deste estudo mostraram associação entre os achados clínicos, histopatológicos, de instabilidade microssatélites e imuno-histoquímicos. Em 13% dos pacientes, houve ausência de imunoexpressão das proteínas de reparo do DNA, e em 20% presença de instabilidade dos microssatélites. Nos doze casos com MSI presente, foi realizado pesquisa da mutação somática para o BRAF, para afastar os casos com hipermetilação na região promotora dos genes MLH1, encontrada em aproximadamente 15% dos casos de cânceres do tipo esporádicos. Em todos os casos o resultado foi negativo, confirmando tratar-se de Síndrome de Lynch.

6.1 Critérios de Amsterdam I e Bethesda Revisados

A Síndrome de Lynch é a forma mais comum de câncer colorretal familiar. A seleção destes pacientes para teste genético ainda é um grande problema. Os critérios, atualmente, utilizados são falhos na detecção destes casos, deixando sem diagnóstico até 50% dos pacientes com idade ≤ 50 anos.

Poucos estudos têm avaliado os critérios revisados de Bethesda^(19,96-97). Dois estudos avaliaram estes critérios em subgrupos de pacientes com alto risco, ao invés, da população geral^(19,97). Um grupo avaliou os critérios revisados de Bethesda em série de pacientes não consecutivos com diagnóstico de câncer colorretal^(96,98). Naquele estudo, o percentual de pacientes com mutação no gene foi de 0,9% (11/1,222)^(96,98). Julié et al⁽¹⁰⁰⁾, mostraram um percentual de positividade de 3,7% (8/214), superior ao relatado na literatura^(17,96,99,101). Noventa pacientes preencheram os critérios revisados de Bethesda (42,1%) e vinte e um pacientes (9,8%) tiveram tumores MSI-positivos. Os critérios revisados de Bethesda falharam em identificar dois de oito probandos.

Neste estudo, todos os casos estudados apresentavam pelo menos um critério revisado de Bethesda e a imuno-histoquímica foi positiva em oito casos (13%). Dois critérios revisados de Bethesda ocorreram em três casos (60%), três em um (20%) e quatro em um caso (20%), nos pacientes com dímeros MSH2/MSH6 positivos. Nos pacientes com dímeros MLH1/PMS2 positivos, dois apresentaram três critérios revisados de Bethesda (67%) e um (33%), dois critérios revisados de Bethesda presentes, mostrando uma grande associação nos pacientes com suspeita da Síndrome de Lynch.

Os critérios revisados de Bethesda são os mais frequentemente utilizados, com maior indicação para testar partes do tumor com diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos⁽⁵⁸⁾. Entretanto, dados recentes têm mostrado que o uso apenas dos Critérios de Bethesda não é suficiente para caracterizar muitos indivíduos com a Síndrome de Lynch⁽⁵⁹⁾.

Nos casos em que os pacientes preenchem os critérios de Amsterdam, o teste de sequenciamento pode ser justificado se nem a imuno-histoquímica e nem a instabilidade de microssatélites forem informativos⁽¹³⁷⁻¹⁴⁰⁾.

Em nossa série, nove pacientes apresentaram os critérios de Amsterdam I, destes, cinco apresentaram IHC alterada e MSI positiva. Em quatro casos, a IHC era não alterada e a MSI foi negativa. Nestes casos, seria indicado o sequenciamento para confirmação de Síndrome de Lynch.

Estudos têm mostrado que a qualidade da história familiar falha no diagnóstico de SL⁽¹³⁷⁻¹⁴⁰⁾. Isto pode ser causado pela falta de conhecimento do paciente sobre sua história médica familiar, famílias pequenas e negligência sobre a história familiar de câncer colorretal por médicos clínicos. Com isso, a história familiar pode ser mal feita e pode influenciar os resultados do estudo, ocorrendo uma subestimação da sensibilidade dos critérios utilizados⁽¹³⁷⁻¹⁴⁰⁾. Entretanto, neste estudo, procuramos ter muita cautela no momento da entrevista com os pacientes e familiares mais próximos anotando todos os dados da história familiar dos doentes.

Um estudo recente⁽⁵⁷⁾ comparando a investigação dos pacientes com câncer colorretal utilizando-se testes moleculares para o diagnóstico da Síndrome de Lynch e os Critérios de Bethesda revisados, demonstrou que a rotina de investigação molecular em pacientes com CCR usando imuno-histoquímica ou MSI tem melhor sensibilidade para detectar portadores de mutações do que os Critérios de Bethesda. Dos 486 (23,2%) pacientes que tinham algum dos critérios de Bethesda revisados, apenas 180 pacientes (8,6%) mostraram perda de expressão de alguma das proteínas dos genes de

reparo e/ou MSI. O sequenciamento gênico revelou que 14 pacientes (0,7%) tiveram mutação nos genes de reparo, sendo que 12 preenchiam pelo menos um dos critérios de Bethesda revisados e dois (14,3%) não preenchiam.

Serrano et al ⁽¹⁰⁶⁾ avaliaram e compararam os critérios de Bethesda com os critérios de Bethesda revisados na detecção do MSI-H e subsequente identificação de mutações nos genes de reparo. Dos 174 casos de câncer colorretal com indicação para a análise da MSI de acordo com os critérios de Bethesda e Bethesda revisados, 114 (65,5%) preencheram os critérios de Bethesda e todos os 174 os critérios de Bethesda revisados. MSI-H foram detectados em 37/114 (32,5%) e a análise mutacional em 14/37 (37,8%) dos pacientes com os critérios de Bethesda e nos casos com Bethesda revisados em 49/174 (28,2%) e a presença de mutações nos genes de reparo em 16/49 (32,7%) dos pacientes. Concluíram que o critério de Bethesda apresentou similar percentagem total para detecção da MSI-H e mutações quando comparado com os critérios de Bethesda revisados. Os critérios de Bethesda revisados implicaram em análises de mais pacientes, entretanto, eles contribuíram com aumento de detecção de dois casos de síndrome de Lynch. Esta diferença tem um impacto significativo no estabelecimento de medidas preventivas e em todos os portadores de mutações que pertencem a estas famílias.

Nesta casuística, o critério 4 de Bethesda revisado foi o mais informativo quanto à presença de MSI. Similarmente, Serrano et al ⁽¹⁰⁶⁾ encontraram no critério 1 de Bethesda (indivíduos com câncer em famílias que preenchem os critérios de Amsterdam) e no critério 4 de Bethesda revisado (câncer colorretal ou tumor associado à síndrome de Lynch, diagnosticado em

um ou mais parentes de primeiro grau, com um dos cânceres diagnosticados abaixo dos 50 anos), e que foram os mais frequentemente associados com a identificação de tumores MSI-H.

6.2 Localização do Tumor

Um aspecto típico do câncer colorretal associado à Síndrome de Lynch é a predominância dos cânceres proximais à flexura cólica esquerda em 56-62%⁽¹⁰³⁻¹⁰⁴⁾.

Uma análise de 1,381 tumores em famílias com a Síndrome de Lynch revelou CCR como a malignidade mais frequente e com 78% dos portadores com mutação em MLH1 e 65% em MSH2. Houve grande número de CCR no cólon direito (60%) e o número de câncer retal foi 21% nos portadores de mutação no MLH1 e 20% no MSH2⁽¹⁰⁵⁾.

Na nossa casuística, 16% dos tumores localizaram-se no cólon direito e 84% no cólon esquerdo. Dos oito casos que apresentaram perda da imunoexpressão das proteínas de reparo, ou seja, imuno-histoquímica positiva e MSI presente, quatro estavam localizados no cólon direito e quatro no cólon esquerdo.

Nos quatro casos em que a MSI era positiva e a imunoexpressão presente, ou seja, imuno-histoquímica negativa, três estavam localizados no cólon esquerdo e um no cólon direito.

Nossos resultados também mostraram predomínio do cólon direito, quando a expressão das proteínas de reparo era perdida.

A pesquisa de mutações somáticas para o BRAF foi de grande valia para afastar os casos de hipermetilação no promotor do gene MLH1, que ocorre em 15% dos casos de câncer colorretal do tipo esporádico. Nessa casuística, todos os casos pesquisados com MSI presente, foram negativos para a pesquisa desta mutação, enfatizando a possível presença da Síndrome de Lynch. Realizou-se a pesquisa em todos os casos MSI-H, incluindo os MLH2/MSH6 para efeito comparativo e de acurácia dos resultados.

6.3 Histopatologia

Diferentes estudos mostram que o CCR na Síndrome de Lynch difere na localização, histologia e história natural daqueles do tipo esporádico. Usualmente, mostram características clínico-patológicas que são sugestivas de instabilidade de microssatélites, incluindo infiltrados linfocíticos intensos, extensas áreas com tumores pouco diferenciados e componente mucinoso na histopatologia^(60,141-142). Neste estudo, a histopatologia foi considerada positiva quando presente pelo menos uma ou mais das características histopatológicas de MSI-H que ocorreu em 72% dos casos, sendo estes achados maiores que os mostrados em estudos anteriores⁽⁶¹⁻⁶²⁾.

Nos últimos anos, tem sido sugerido que a histopatologia poderia ser útil em selecionar pacientes com CCR para testes moleculares em pacientes com a Síndrome de Lynch⁽⁶³⁻⁶⁶⁾. A histopatologia limitaria os testes moleculares em pacientes com aspectos histopatológicos de MSI-H, reduzindo desta forma, a

sobrecarga do teste molecular em 60%, quando comparado em testar todos os pacientes que preenchem os critérios de Bethesda revisados. O mais importante é que a histopatologia poderia ajudar a identificar a Síndrome de Lynch entre pacientes com início tardio e nenhuma história familiar de câncer⁽⁶¹⁾.

Neste trabalho, apenas um paciente, apresentou histopatologia negativa (12,5%), quando a imuno-histoquímica foi positiva. A imuno-histoquímica estava inalterada em 53 casos, destes, 16 (30%) tinham histopatologia negativa para a Síndrome de Lynch, 21 pacientes (40%) apresentaram apenas um critério histopatológico para a Síndrome de Lynch, oito pacientes apresentaram dois critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch, sete pacientes (13%) apresentaram três critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch e um paciente (2%) apresentou quatro critérios histopatológicos para a Síndrome de Lynch, mostrando que quanto maior o número de critérios histopatológicos em um tumor, maior a chance do paciente de apresentar o diagnóstico de SL.

O trabalho de Jenkins et al.⁽⁶⁰⁾ mostrou que a histopatologia pode identificar quase todos os casos de câncer colorretal diagnosticados antes dos 60 anos. Alguns dos aspectos no modelo MsPath, tais como a diferenciação mucinosa, são mais específicas do MSI-H, enquanto outros, como a presença de tumor infiltrado por linfócitos e sub sítios anatômicos, são mais sensíveis. Este modelo provou ser instrumento de investigação da Síndrome de Lynch em indivíduos entre 50-60 anos sem história familiar sugestiva.

Por outro lado, o estudo de Urso et. al.⁽¹⁸⁾ revelou que a histopatologia pode não ser um elemento tão importante na caracterização do fenótipo

relacionado à MSI. Estes autores mostraram que sete de oito casos MSI-H poderiam não ter sido diagnosticados, se os aspectos histopatológicos associados à MSI fossem usados para a investigação dos pacientes com tumores MSI e idade entre 51 a 60 anos.

6.4 Imuno-histoquímica

A imuno-histoquímica tem a vantagem de identificar o gene envolvido no defeito do gene de reparo e a análise do gene pode ser o alvo para aquele gene de reparo específico. Entretanto, a imuno-histoquímica pode identificar apenas a perda de proteínas devido a mutações nos genes de reparo conhecidas, todavia, a análise da MSI pode indicar outros genes de reparo potencialmente patogênicos^(17,88-90).

Nesse estudo, dos casos com imuno-histoquímica não alterada, quatro casos com pacientes apresentando idade ≥ 50 anos, foram positivos para a instabilidade dos microssatélites. Destes quatro casos, todos os pacientes apresentaram idade superior aos 60 anos (63, 64, 69 e 70 anos).

Um ponto negativo deste trabalho seria o não estudo do sequenciamento dos genes de reparo, por não estar disponível em nosso Serviço. Por outro lado, existe controvérsias na realização e interpretação das análises desses genes^(55,91) e a existência de outros genes ainda não detectados, que não poderíamos excluir como causas genéticas para SL.

A limitação dos testes para o tumor nos pacientes com câncer colorretal antes dos 50 anos faz com que 50% dos pacientes com a Síndrome de Lynch não sejam diagnosticados^(59,101-102).

A sensibilidade da imuno-histoquímica para as proteínas de reparo varia de 77% a 83%. A sensibilidade relatada de MSI é de 89% para MLH1/MSH2 e 77% para MSH6⁽⁹⁵⁾. A especificidade do teste da MSI e IHQ diminui de 90% para 87% para 83% para pacientes com CCR diagnosticado com 50, 60 e 70 anos de idade, respectivamente (dados não publicados)⁽⁹²⁾. Isto é resultado do aumento na prevalência de hipermetilação somática do MLH1 que correlaciona com mutações BRAF no DNA do tumor, e a vasta maioria dos pacientes com mais de 70 anos não precisam de testes preditivos.

Para este estudo, a sensibilidade da IHC foi de 66,67% (variando de 38,78% até 86,22%); a especificidade foi 100% (variando de 91,1% até 100%); o valor preditivo positivo foi 100% (variando de 62,25% até 100%) e o valor preditivo negativo 92,45% (variando de 81,51% até 97,44%).

Se os testes de MSI/IHQ deveriam ser realizados em todos os pacientes com CCR ou apenas baseados na história pessoal ou familiar, continua sendo um tema em debate⁽⁹³⁻⁹⁴⁾.

6.5 Instabilidade de Microssatélites

Em 1996, as Diretrizes de Bethesda foram desenvolvidas para ajudar a determinar quais tumores poderiam ser testados para MSI e foram baseados

em critérios clínicos, tais como, CCR diagnosticado em idade ≤ 50 anos ou certos aspectos de história familiar de câncer.

Ferreira et al.⁽⁸⁷⁾ detectaram CCR com MSI-H em 33/41 famílias (80%), sendo os restantes MSI-S. Nas famílias com suspeita de Síndrome X registrou-se menor número de casos de CCR e uma menor frequência de tumores extracolônicos do espectro da Síndrome de Lynch. Os tumores MSI-S predominaram no cólon distal/reto e apresentaram numa menor porcentagem, a produção de muco e infiltrado linfocitário peri-tumoral. Em 70% das famílias com CCR MSI-H, identificaram-se mutações nos genes de reparo do DNA e em nenhuma das MSI-S. A via supressora foi seguida em dois casos e uma via alternativa em outros dois. Os restantes quatro casos não foram informativos; contudo 5/8 (63%) apresentaram perdas alélicas no gene APC. Concluíram que as famílias com critérios de Amsterdam estáveis apresentaram características particulares, reforçando a existência de uma entidade diferente da SL.

Neste estudo, encontramos MSI presente em doze casos (20%). Nos quatro casos com MSI presente e imuno-histoquímica não alterada, todos os pacientes apresentaram idade superior aos 60 anos (63, 64, 69 e 70 anos), enfatizando, talvez, a queda de especificidade da IHC com o aumento da idade, conforme relatado por Kastrinos et al.⁽⁹²⁾

Nos nove casos (15%) em que Amsterdam I estava presente, em quatro a MSI foi negativa e a IHC não alterada.

No caso número seis: temos uma Síndrome X, pois observamos clínica presente com IHC e MSI ausente.

Seis casos (14, 15, 31, 33, 40 e 58) com Amsterdam I presente e MSI presente, cinco também apresentaram IHC alterada. Em apenas um caso (caso 40), a MSI estava presente e a IHC não alterou. Este caso poderia reforçar a hipótese da existência de outro gene, ainda, não descoberto e que estaria envolvido na carcinogênese da Síndrome de Lynch.

O caso 32, foi o único que apresentou MSI-L, chamando atenção para o fato de que a localização do tumor era no cólon esquerdo, idade da paciente > 60 anos, histopatologia negativa e IHC negativa. Neste caso, poderíamos especular uma nova entidade para SL nos casos com MSI-L.

6.6 Perspectivas

As perspectivas para a sequência deste estudo seriam a confirmação dos 12 casos com imuno-histoquímica e instabilidade microssatélites presentes, com o sequenciamento genético que não foi possível durante esta pesquisa.

Esperamos, em curto prazo, darmos continuidade na confirmação destes casos suspeitos para melhores conclusões sobre as características genéticas dos nossos pacientes.

Este estudo mostra, ainda, que os portadores de câncer colorretal com fenótipo MSI precisam ser melhores caracterizados quanto à presença de outros genes alvos ainda não descobertos e que possam estar envolvidos na via molecular que determina esta Síndrome. Ou a existência de outras vias ou subgrupos de tumores esporádicos com características clínicas, histopatológicas e fenotípicas semelhantes aos da Síndrome de Lynch, mas que não compartilham a mesma via na carcinogênese.

Atualmente, várias abordagens estão disponíveis para identificar indivíduos e famílias com risco para a Síndrome de Lynch, como a seleção de indivíduos baseados no preenchimento dos critérios clínicos e testes moleculares dos tumores para evidência de instabilidade de microssatélites (MSI), chamada de universal, por testar todos os casos de CCR em pacientes com idade menor ou igual a setenta anos ou abordagem alvo (baseada na idade ou critérios de história familiar), seguidos pelo teste genético, para aqueles considerados de risco aumentado ⁽¹²⁷⁾.

Ainda que a estratégia universal seja custo-efetiva, ela poderá falhar em identificar casos onde mutações nos genes de reparo interrompam a sua função, mas não resulte em instabilidade de microssatélites, como visto nos casos de mutações no MSH6 ou quando resultados da IHC são normais apesar de uma proteína MMR não funcionando ⁽¹²⁷⁾.

Modelos preditivos foram desenvolvidos para quantificar o risco de detectar uma mutação baseado na história pessoal e familiar, ajudando a decidir quem poderia ser encaminhado para mais avaliação e/ou teste genético ⁽¹³³⁾.

A quantificação de risco baseado em modelos preditivos oferece meios adicionais para identificar indivíduos com maior risco de ser portador de mutações, se afetado ou não afetado pelo câncer.

Se a estratificação de risco baseada nos modelos preditivos fosse utilizada nos nossos casos com suspeita de SL, poderia apresentar acréscimos com novos casos não encontrados com os critérios baseados na história clínica pessoal e familiar? É uma questão hipotética para uma nova pesquisa.

Através da criação deste escore que incorporou as principais variáveis clínico-patológicas, imuno-histoquímica e de instabilidade de microssatélite, este estudo auxilia na detecção da SL, convidando a ser validado em outros Serviços e/ou através da ampliação da casuística deste estudo e que somado ao sequenciamento, será de grande valia no diagnóstico e seguimento destes pacientes e seus familiares. Este escore também mostrou ser um bom preditor para identificar os casos negativos da Síndrome.

Ademais, testes genéticos mais baratos e com acurácia elevada e de fácil execução serão incorporados na prática diária, em curto tempo. A identificação de novos genes alterados ou outras alterações epigenéticas promoverão melhor entendimento da evolução clínica dos nossos pacientes e uma orientação terapêutica adequada.

7 CONCLUSÕES

Dentre as condições de realização desta pesquisa, pode-se concluir que:

1. A frequência de Síndrome de Lynch nos pacientes submetidos à ressecção por câncer e com história familiar foi de 20%, concordante com a literatura.
2. O critério 4 de Bethesda Modificado (câncer colorretal ou tumor associado à Síndrome de Lynch, diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau, com um dos cânceres diagnosticados abaixo dos 50 anos) associou-se mais fortemente à presença de instabilidade de microssatélites na população estudada.
3. O escore desenvolvido neste estudo contribui como uma ferramenta prática na ampliação diagnóstica da SL.

8 ANEXOS

Anexo I – Critérios de Amsterdam

HISTÓRICO FAMILIAR	
Amsterdam I	
1.	três parentes com câncer de cólon, sendo dois deles parentes de primeiro grau do terceiro.
2.	duas gerações acometidas por câncer de cólon.
3.	um paciente com câncer de cólon com diagnóstico antes dos 50 anos.
4.	exclusão de polipose adenomatosa familiar.
Amsterdam II	
1.	três parentes com um câncer associado ao HNPCC (cólon, útero, célula transicional, ovário, intestino delgado).
2.	dois são parentes de primeiro grau do terceiro.
3.	duas gerações acometidas por câncer de cólon.
4.	um paciente com câncer de cólon com diagnóstico antes dos 50 anos.
5.	exclusão de polipose adenomatosa familiar.

Anexo II – Critérios de Bethesda (revisados) para indicação de pesquisa de instabilidade de microssatélites

1. CCR diagnosticado antes dos 50 anos.
2. CCR múltiplo ou câncer associado ao HNPCC*.
3. CCR com histologia MSI-H diagnosticado em indivíduo com menos de 60 anos de idade.
4. CCR ou câncer associado ao HNPCC diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau, desde que uma das neoplasias tenha ocorrido antes dos 50 anos de idade.
5. CCR ou câncer associado ao HNPCC diagnosticado em dois ou mais parentes de primeiro ou segundo grau, em qualquer idade.

**Tumores associados ao HNPCC incluem: além do CCR, carcinoma de endométrio, ovário, estômago, intestino delgado, pelve renal, ureter, trato biliar, pâncreas, ou cérebro (principalmente o glioblastoma multiforme).*

Anexo III Critérios Histológicos na Síndrome de Lynch

1. Tumor infiltrado por linfócitos
2. Reação linfocítica semelhante à Doença de Crohn
3. Diferenciação mucinosa ou anel de sinete
4. Modelo de crescimento sólido, indiferenciado ou medular.

Anexo IV – Ficha padronizada para interrogatório pessoal dos pacientes

DADOS PESSOAIS

Número do paciente

Data

Registro

Nome

Hospital

Idade

Sexo

Raça

Local de nascimento

Endereço

Telefone

Médico

HISTÓRICO FAMILIAR

Amsterdam I:

1. três parentes com câncer de cólon, sendo dois deles parentes de primeiro grau do terceiro;
2. duas gerações acometidas por câncer de cólon;
3. um paciente com câncer de cólon com diagnóstico antes dos 50 anos;
4. excluindo-se poliposes.

Amsterdam II:

1. três parentes com um câncer associado ao HNPCC (cólon, útero, célula transicional, ovário, intestino delgado);
2. dois são parentes de primeiro grau do terceiro;
3. duas gerações acometidas por câncer de cólon;
4. um paciente com câncer de cólon com diagnóstico antes dos 50 anos;
5. excluindo-se poliposes.

Bethesda revisados:

1. CCR diagnosticado antes dos 50 anos;
2. CCR múltiplo ou câncer associado ao HNPCC (Ca de endométrio, intestino delgado, pelve urinária, trato biliar, estômago, ovário, pâncreas, ou cérebro (principalmente o glioblastoma multiforme));
3. CCR com histologia MSI associada com diagnóstico antes dos 60 anos;
4. CCR ou câncer associado ao HNPCC diagnosticado em até um parente de primeiro grau antes dos 50 anos;
5. CCR ou câncer associado ao HNPCC diagnosticado em até dois parentes de primeiro ou segundo grau em qualquer idade.

PRODUTO DE COLECTOMIA

Câncer – número

Tamanho

Localização (cólon direito ou cólon esquerdo)

Característica (ulcerado, vegetante, estenosante, úlcero-vegetante)

ANÁTOMO PATOLÓGICO

Grau de diferenciação: bem, moderadamente e pobremente diferenciados

Componente mucinoso: presente ou ausente

Componente sinete: presente ou ausente

Componente medular: presente ou ausente

Reação crohn-like: presente ou ausente

Linfócitos intratumor: presente ou ausente

Expansivo: sim ou não

Estadio TNM

IMUNO-HISTOQUÍMICA

Alterada

Não alterada

INSTABILIDADE MICROSSATÉLITE

MSI-H

MSI-L

MSI-S

ANEXO V- Casos com imuno-histoquímica positiva e negativa

DIMEROS	Bethesda revisados	Histopatologia	MSI
Imuno-histoquímica alterada			
MLH1/PMS2	B1, B4, B3	CM, LIT, RCL, EXP	Positiva
MLH1/PMS2	B4, B5	LIT	Positiva
MLH1/PMS2	B1, B5, B3	CM, LIT, RCL, EXP	Positiva
MSH2/MSH6	B1, B4, B5, B3	LIT, EXP	Positiva
MSH2/MSH6	B2, B4, B5	CM, CS, LIT, RCL	Positiva
MSH2/MSH6	B4, B5	Negativa	Positiva
MSH2/MSH6	B1, B3	CM, CS, LIT	Positiva
MSH2/MSH6	B1, B3	CM, LIT	Positiva
Imuno-histoquímica não alterada	Bethesda revisados	Histopatologia	MSI
1	B5	Negativa	Negativa
2	B1, B3	CS, LIT	Negativa
3	B5	EXP	Negativa
4	B5	LIT	Negativa
5	B5	CS, LIT	Negativa
6	B5, B3	LIT, RCL, EXP	Negativa
7	B1, B5, B3	LIT	Negativa
8	B5	LIT, EXP	Negativa
9	B5	Negativa	Negativa
10	B5	LIT, RCL, EXP	Negativa
11	B5	LIT	Negativa
12	B1, B5, B3	CM, LIT, RCL	Negativa
13	B1	Negativa	Negativa
14	B1, B5, B3	CM	Negativa
15	B1, B5, B3	CM, CS, LIT, RCL	Negativa
16	B1	Negativa	Negativa
17	B5	CM, EXP	Negativa
18	B1	Negativa	Negativa
19	B1, B3	CM, CS, LIT	Negativa
20	B5	EXP	Negativa
21	B1	Negativa	Negativa
22	B2, B5	Negativa	Negativa
23	B4, B5	CMED, LIT, EXP	Positiva
24	B1, B3	EXP	Negativa
25	B5	LIT	Negativa
26	B4, B5	Negativa	Negativa
27	B5	CM	Negativa
28	B5	Negativa	Positiva
29	B5	CM, CS	Negativa
30	B4, B5	Negativa	Negativa
31	B1, B3	CM, CS, LIT	Negativa
32	B5, B3	LIT	Negativa
33	B5	Negativa	Negativa
34	B4	EXP	Negativa
35	B4, B5	LIT, EXP	Positiva
36	B1, B4, B3	LIT	Negativa
37	B1, B5, B3	CM	Negativa
38	B1, B5, B3	LIT	Negativa
39	B1, B5	Negativa	Negativa
40	B1, B5, B3	RCL	Negativa
41	B1, B5	Negativa	Negativa
42	B1, B5, B3	EXP	Negativa
43	B1, B5, B3	CM, RCL, EXP	Negativa
44	B4, B5	CM, LIT	Negativa
45	B5	LIT	Negativa
46	B1, B3	LIT	Negativa
47	B1, B3	EXP	Negativa
48	B2, B4, B5	CM, EXP	Negativa
49	B1	Negativa	Negativa
50	B1	Negativa	Negativa
51	B4	Negativa	Negativa
52	B5	LIT	Positiva
53	B5	EXP	Negativa

LIT- linfócitos intratumor, EXP- expansivo, CM- componente mucinoso, CS- componente sinete, CMED- componente medular, RCL- reação Crohn-Like. Imuno-histoquímica considerada Positiva- quando não houve imunoexpressão das proteínas de reparo e Negativa- quando houver imunoexpressão das proteínas de reparo.

ANEXO VI - Casos com MSI positiva

Casos	BAT25	BAT26	NR21	NR24	Mono27	Penta C	Penta D	MSI
14	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	MSI-H
15	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	MSI-H
22	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	MSI-H
31	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	MSI-H
33	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	MSI-H
42	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Sim	MSI-H
50	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	MSI-H
58	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	MSI-H
26	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Não	Não	MSI-H
32	Não	Não	Não	Não	Não	Sim	Não	MSI-L
40	Não	Não	Inc.	Não	Não	Sim	Sim	MSI-H
60	Inc.	Inc.	Sim	Sim	Inc.	Inc.	Sim	MSI-H

SIM = Marcador instável, NÃO = Marcador estável, Inc.=Inconclusivo = Não foi possível definir.
 Classificação: MSI-L = 1 marcador instável, MSI-H = 2 ou mais marcadores instáveis (segundo classificação de Bethesda: MSI-H $\geq$ 30% marcadores instáveis).

ANEXO VII**Casos com Amsterdam I presentes**

Casos	HISTOPATOLOGIA	MSI	DÍMEROS
6	Positiva	Negativo	Negativo
14	Positiva	Positivo	MSH2/MSH6
15	Positiva	Positivo	MLH1/PMS2
16	Positiva	Negativo	Negativo
31	Negativa	Positivo	MSH2/MSH6
33	Positiva	Positivo	MLH1/PMS2
35	Negativa	Negativo	Negativo
40	Positiva	Positivo	Negativo
58	Positiva	Positivo	MLH1/PMS2

ANEXO VIII

Tabela – Localização dos tumores no cólon

Casos	Sexo	Idade	Localização
1	M	56	Cólon esquerdo
2	F	28	Cólon esquerdo
3	F	70	Cólon esquerdo
4	F	65	Cólon esquerdo
5	F	60	Cólon esquerdo
6	M	50	Cólon esquerdo
7	M	46	Cólon esquerdo
8	M	80	Cólon direito
9	F	77	Cólon esquerdo
10	F	65	Cólon esquerdo
11	F	76	Cólon esquerdo
12	M	28	Cólon esquerdo
13	F	35	Cólon esquerdo
14	M	44	Cólon direito
15	M	34	Cólon direito
16	M	48	Cólon esquerdo
17	M	36	Cólon direito
18	F	49	Cólon esquerdo
19	M	63	Cólon esquerdo
20	F	45	Cólon esquerdo
21	F	31	Cólon esquerdo
22	M	63	Cólon direito
23	F	70	Cólon esquerdo
24	M	49	Cólon esquerdo
25	F	85	Cólon esquerdo
26	F	64	Cólon esquerdo
27	F	26	Cólon esquerdo
28	M	70	Cólon esquerdo
29	M	73	Cólon direito/cólon esquerdo
30	F	87	Cólon esquerdo
31	F	61	Cólon esquerdo

Continua...

Conclusão da Tabela - Localização dos tumores no cólon

Casos	Sexo	Idade	Localização
32	F	69	Cólon esquerdo
33	M	53	Cólon esquerdo
34	F	71	Cólon esquerdo
35	F	22	Cólon esquerdo
36	F	45	Cólon esquerdo
37	F	54	Cólon esquerdo
38	F	55	Cólon esquerdo
39	F	60	Cólon esquerdo
40	F	70	Cólon esquerdo
41	M	43	Cólon esquerdo
42	M	27	Cólon esquerdo
43	M	38	Cólon esquerdo
44	M	44	Cólon esquerdo
45	F	30	Cólon esquerdo
46	F	48	Cólon esquerdo
47	M	47	Cólon esquerdo
48	F	48	Cólon esquerdo
49	M	47	Cólon direito
50	M	46	Cólon direito
51	F	61	Cólon esquerdo
52	F	75	Cólon esquerdo
53	F	44	Cólon esquerdo
54	F	45	Cólon esquerdo
55	F	67	Cólon esquerdo
56	F	25	Cólon esquerdo
57	F	40	Cólon esquerdo
58	F	37	Cólon esquerdo
59	M	57	Cólon esquerdo
60	M	63	Cólon direito
61	M	79	Cólon direito

ANEXO IX

Tabela- Imuno-histoquímica

Casos	Sexo	Idade	MSH2	MLH1	MSH6	PMS2
1	M	56	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
2	F	28	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
3	F	70	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
4	F	65	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
5	F	60	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
6	M	50	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
7	M	46	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
8	M	80	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
9	F	77	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
10	F	65	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
11	F	76	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
12	M	28	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
13	F	35	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
14	M	44	Alterada	Não alterada	Alterada	Não alterada
15	M	34	Não alterada	Alterada	Não alterada	Alterada
16	M	48	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
17	M	36	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
18	F	49	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
19	M	63	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
20	F	45	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
21	F	31	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
22	M	63	Alterada	Não alterada	Alterada	Não alterada
23	F	70	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
24	M	49	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
25	F	85	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
26	F	64	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
27	F	26	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
28	M	70	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
29	M	73	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
30	F	87	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
31	F	61	Alterada	Não alterada	Positivo	Negativo

Continua...

Conclusão da Tabela – Imuno-histoquímica

Casos	Sexo	Idade	MSH2	MLH1	MSH6	PMS2
32	F	69	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
33	M	53	Não alterada	Alterada	Não alterada	Alterada
34	F	71	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
35	F	22	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
36	F	45	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
37	F	54	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
38	F	55	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
39	F	60	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
40	F	70	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
41	M	43	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
42	M	27	Alterada	Não alterada	Alterada	Não alterada
43	M	38	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
44	M	44	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
45	F	30	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
46	F	48	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
47	M	47	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
48	F	48	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
49	M	47	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
50	M	46	Alterada	Não alterada	Alterada	Não alterada
51	F	61	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
52	F	75	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
53	F	44	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
54	F	45	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
55	F	67	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
56	F	25	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
57	F	40	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
58	F	37	Não alterada	Alterada	Não alterada	Alterada
59	M	57	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
60	M	63	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada
61	M	79	Não alterada	Não alterada	Não alterada	Não alterada

ANEXO X

Tabela- Aspectos Histopatológicos

Casos	Sexo	Idade	Componente mucinoso	Componente sinete	Componente medular	Linfocitos Intratumor	Reação Crohn-like	Expansivo
1	M	56	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
2	F	28	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
3	F	70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
4	F	65	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
5	F	60	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
6	M	50	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
7	M	46	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
8	M	80	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
9	F	77	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
10	F	65	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
11	F	76	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
12	M	28	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
13	F	35	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
14	M	44	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
15	M	34	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
16	M	48	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
17	M	36	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
18	F	49	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19	M	63	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
20	F	45	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
21	F	31	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
22	M	63	Presente	Presente	Ausente	Presente	Presente	Ausente
23	F	70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
24	M	49	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
25	F	85	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
26	F	64	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Ausente	Presente
27	F	26	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
28	M	70	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
29	M	73	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
30	F	87	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
31	F	61	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente

Continua...

Conclusão da Tabela – Aspectos Hispatológicos

Casos	Sexo	Idade	Componente mucinoso	Componente sinete	Componente medular	Linfócitos Intratumor	Reação Crohn-like	Expansivo
32	F	69	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
33	M	53	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
34	F	71	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
35	F	22	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
36	F	45	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
37	F	54	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
38	F	55	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
39	F	60	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
40	F	70	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente
41	M	43	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
42	M	27	Presente	Presente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
43	M	38	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
44	M	44	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
45	F	30	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
46	F	48	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
47	M	47	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
48	F	48	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
49	M	47	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
50	M	46	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
51	F	61	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
52	F	75	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
53	F	44	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
54	F	45	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
55	F	67	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
56	F	25	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
57	F	40	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
58	F	37	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente	Presente
59	M	57	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
60	M	63	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente
61	M	79	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente

ANEXO XI

Tabela- Critérios de Amsterdam I e Bethesda revisados

Casos	Sexo	Idade	Amsterdam I	Bethesda revisados				
				1	2	3	4	5
1	M	56	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
2	F	28	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
3	F	70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
4	F	65	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
5	F	60	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
6	M	50	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
7	M	46	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
8	M	80	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
9	F	77	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
10	F	65	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
11	F	76	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
12	M	28	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
13	F	35	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
14	M	44	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
15	M	34	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
16	M	48	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
17	M	36	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
18	F	49	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
19	M	63	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
20	F	45	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
21	F	31	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
22	M	63	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente
23	F	70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
24	M	49	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
25	F	85	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente
26	F	64	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
27	F	26	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
28	M	70	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
29	M	73	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
30	F	87	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
31	F	61	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente

Continua...

Conclusão da Tabela- Critérios de Amsterdam I e Bethesda revisados

Casos	Sexo	Idade	Amsterdam I	Bethesda revisados				
				1	2	3	4	5
32	F	69	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
33	M	53	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
34	F	71	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
35	F	22	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
36	F	45	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
37	F	54	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
38	F	55	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
39	F	60	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
40	F	70	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
41	M	43	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
42	M	27	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
43	M	38	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
44	M	44	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
45	F	30	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
46	F	48	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
47	M	47	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
48	F	48	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
49	M	47	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
50	M	46	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
51	F	61	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Presente
52	F	75	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
53	F	44	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
54	F	45	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
55	F	67	Ausente	Ausente	Presente	Ausente	Presente	Presente
56	F	25	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
57	F	40	Ausente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
58	F	37	Presente	Presente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
59	M	57	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente	Ausente
	M	63	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente
61	M	79	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Presente

9 REFERÊNCIAS

1. American Cancer Society. *Cancer prevention and early detection: facts and figures 2001*. Atlanta, Ga; 2001.
2. Yood MU, Oliveira S, Boyer JG. Colon polyp recurrence in a managed care population. *Arch Intern Med*. 2003;163(4):422-6.
3. Whelan SL , Parkin DM, Masuyer E. *Patterns of cancer in five continents*. Lyon: World Health Organization; 1990.
4. Sandler RS. Epidemiology and risk factors of colorectal cancer. *Gastroenterol Clin N Am*. 1996;25(4):717-35.
5. Campos FGCM, Caravatto PPP, Waitzberg DL, Habr-Gama A, Kiss DR, Gama-Rodrigues JJ. Diet and colorectal cancer: current evidence for etiology and prevention. *Nutr Hosp*. 2005;20(1):18-25.
6. Winawer SJ, Zauber AG. The advanced adenoma as the primary target of screening. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 2002;12(1):1-9.
7. Khellar SK, Disario JA. Colon cancer screening sigmoidoscopy or colonoscopy. *Gastrointest Endosc Clin N Am*. 1997;7(3):365-86.
8. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, Whiter R, Smits AMM, Bos JL. Genetic alterations during colorectal tumor development. *N Engl J Med*. 1988;319(9):525-32.
9. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen HJ, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen, GM, Kinzler, KW, Vogelstein B, de La Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):812-6.

10. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, Wilson JKV, Parsons RE, Jen J, Papadopoulos N, Peltomäki P, de la Chapelle A, Hamilton SR. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet.* 1995;9(1):48-55.
11. Wu Y, Nyström-Lahti M, Osinga J, Looman MWG, Peltomäki P, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Hofstra RM, Buys CH. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. *Genes Chromosomes Cancer.* 1997;18(4):269-78.
12. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The international collaborative group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum.* 1991;34(5):424-5.
13. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the international collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology.* 1999;116(6):1453-6.
14. Kievit W, de Bruin JH, Adang EM, Ligtenberg MJ, Nagengast FM, Van Krieken JH, Hoogerbrugge N. Current clinical selection strategies for identification of hereditary non-polyposis colorectal cancer families are inadequate (a meta-analysis). *Clin Genet.* 2004;65(4):308-16.
15. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomäki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-8.

16. Umar A, Risinger JL, Hawk ET, Barret JC. Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(2):153-8.
17. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Nakagawa H, Sotamaa K, Prior TW, Westman J, Panescu J, Fix D, Lockman J, Comeras I, de la Chapelle A. Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med*. 2005; 352(18):1851-60.
18. Urso E, Pucciarelli S, Agostini M, Maretto I, Mescoli C, Bertorelle R, Viel A, Rugge M, Nitti D. Proximal colon cancer in patients aged 51-60 years of age should be tested for microsatellites instability. A comment on the Revised Bethesda Guidelines. *Int J Colorectal Dis*. 2008;23(8):801-6.
19. Gologan A, Krasinskas A, Hunt J, Thull DL, Farkas L, Sepulveda AR. Performance of the Revised Bethesda Guidelines for identification of colorectal carcinomas with a high level of microsatellite instability. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(11):1390-7.
20. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1997;89(23):1758-62.
21. Peltomaki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Green JS, Jass JR, Weber JL, Leach FS, et al. Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science*. 1993;260(5109):810-2.
22. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science*. 1993;260(5109):816-9.
23. Ottini L, Falchetti M, Lupi R, Rizzolo P, Agnese V, Colucci G, Bazan V, Russo A. Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives. *Ann Oncol*. 2006;17(Suppl 7):97-102.

24. Zheng L, Wang L, Ajani J, Xie K. Molecular basis of gastric cancer development and progression. *Gastric Cancer*. 2004;7(2):61-77.
25. Bocker T, Diermann J, Friedl W, Gebert J, Holinski-Feder E, Karner-Hanusch J, von Knebel-Doeberitz M, Koelble K, Moeslein G, Schackert HK, Wirtz HC, Fishel R, Rüschoff J. Microsatellite instability analysis: a multicenter study for reliability and quality control. *Cancer Res*. 1997;57(21):4739-43.
26. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res*. 1997;57(21):4749-56.
27. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. 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(22):5248-57.
28. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA). Estimativa 2014 - incidência de câncer no Brasil. [citado 3 out 2013]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.
29. Lynch HT, Smyrk T, Lynch JF. Molecular genetics and clinical-pathology features of hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome): historical journey from pedigree anecdote to molecular genetic confirmation. *Oncology*. 1998;55(2):103-8.
30. Cantor D. The frustrations of families: Henry Lynch, heredity, and cancer control, 1962-1975. *Med Hist*. 2006;50(3):279-302.

31. 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*. 1913;12:546-55.
32. 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(6420):558-61.
33. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell*. 1993;75(5):1027-38.
34. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomäki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell*. 1993;75(6):1215-25.
35. 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.
36. WHO. *WHO histological classification of tumours of colon and rectum*. Hamilton SR, Vogelstein B, Kudo S, Riboli E, Nakamura S, Hainaut P, Rubio CA, Sobin LH, Fogt F, Winawer SJ, Goldger DE, Jass JR. Tumours of the colon and rectum. chap. 6; p. 104-19.
37. Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA, Seminara D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA*. 2005;293(16):1979-85.

38. Jass JR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol*. 2006;12(31):4943-50.
39. Mecklin JP, Sipponen P, Jarvinen HJ. Histopathology of colorectal carcinomas and adenomas in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum*. 1986;29(12):849-53.
40. Mueller-Koch Y, Vogelsang H, Kopp R, Lohse P, Keller G, Aust D, Muders M, Gross M, Daum J, Schieman U, Grabowski M, Scholz M, Kerker B, Becker I, Henke G, Holinski-Feder E. Hereditary non-polyposis colorectal câncer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. *Gut*. 2005;54(12):1733-40.
41. Jass JR. Role of the pathologist in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):215-24.
42. Muller W, Burgart LJ, Krause-Paulus R, Thibodeau SN, Almeida M, Edmonston TB, Boland CR, Sutter C, Jass JR, Lindblom A, Lubinski J, MacDermot K, Sanders DS, Morreau H, Müller A, Oliani C, Orntoft T, Ponz De Leon M, Rosty C, Rodriguez-Bigas M, Rüschoff J, Ruzskiewicz A, Sabourin J, Salovaara R, Möslin G; ICG-HNPCC (International Collaborative Group). The reliability of immunohistochemistry as a prescreening method for the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)- results of an international collaborative study. *Fam Cancer*. 2001;1(2):87-92.
43. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic setting: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol*. 2001;159(6):2107-16.

44. Tautz D. Hypervariability of sample sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 1989;17(16):6463-71.
45. Weber J, May P. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Gen.* 1989;44(3):388-96.
46. Peltomäki P, Løthe RA, Aaltonen LA, Pylkkänen L, Nyström-Lahti M, Seruca R, David L, Holm R, Ryberg D, Haugen A, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary non-polyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer.* 1993;53(24):5853-5.
47. De Jong AE, van Puijnenbroek M, Hendriks Y, Tops C, Wijnen J, Ausems MG, Meijers-Heijboer H, Wagner A, van Os TA, Bröcker-Vriends AH, Vasen HF, Morreau H. Microsatellite instability, immunohistochemistry, and additional PMS2 staining in suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2004;10(3):972-80.
48. Gill S, Lindor NM, Burgart LJ, Smalley R, Leontovich O, French AJ, Goldberg RM, Sargent DJ, Jass JR, Hopper JL, Jenkins MA, Young J, Barker MA, Walsh MD, Ruzskiewicz AR, Thibodeau SN. Isolated loss of PMS2 expression in colorectal cancers: frequency, patient age and familial aggregation. *Clin Cancer Res.* 2005;11(8):6466-71.
49. Hendriks YMC, Jagmohan-Changur S, van der Klift HM, Morreau H, van Puijnenbroek M, Tops C, van Os T, Wagner A, Ausems MG, Gomez E, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH, Vasen HF, Wijnen JT. Heterozygous mutations in PMS2 cause hereditary non-polyposis colorectal carcinoma (Lynch syndrome). *Gastroenterology.* 2006;130(2):312-22.
50. Clendenning M, Hampel H, LaJeunesse J, Lindblom A, Lockman J, Nilbert M, Senter L, Sotamaa K, de la Chapelle A. Longrange PCR facilitates the identification of PMS2-specific mutations. *Hum Mutat.* 2006;27(5):490-5.

-
51. Vasen HF, Hendriks Y, de Jong Ae, van Puijenbroek M, Tops C, Brocker-vriends AH, Wijnen JT, Morreau H. Identification of HNPCC by molecular analysis of colorectal and endometrial tumors. *Dis Markers*. 2004;20(4-5):207-13.
 52. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). Na updated review. *Cancer*. 1996;78(6):1149-67.
 53. Muto T, Bussey HJ, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer*. 1975;36(6):2251-70.
 54. Lynch HT, de la Chapelle A. Genomic medicine hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2003;348(10):919-32.
 55. De la Chapelle A. A genetic predisposition to colorectal cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004;4(10):769-80.
 56. Stoffel E, Mukherjee B, Raymond VM, Tayob N, Kastrinos F, Sparr J, Wang F, Bandipalliam P, Syngal S, Gruber SB. Calculation of risk of colorectal and endometrial cancer among patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2009;137(5):1621-7.
 57. Pérez-Carbonell L, Ruiz-Ponte C, Guarinos C, Alenda C, Payá A, Brea A, Egoavil CM, Castillejo A, Barberá VM, Bessa X, Xicola RM, Rodríguez-Soler M, Sánchez-Fortún C, Acame N, Castellví-Bel S, Piñol V, Balaguer F, Bujanda L, De-Castro ML, Llor X, Andreu M, Carracedo A, Soto JL, Castells A, Jover R. Comparison between universal molecular screening for Lynch Syndrome and revised population-based cohort of patients with colorectal cancer. *Gut*. 2012;61(6):865-72.
 58. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Rüschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA,

- Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst.* 2004;96(4):261-8.
59. Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J, Fix D, Lockman J, LaJeunesse J, Comeras I, de la Chapelle A. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009;26(35):5783-8.
60. Jenkins MA, Hayashi S, O'Shea AM, Burgart LJ, Smyrk TC, Shimizu D, Waring PM, Ruszkiewicz AR, Pollett AF, Redston M, Barker MA, Baron JA, Casey GR, Dowty JG, Giles GG, Limburg P, Newcomb P, Young JP, Walsh MD, Thibodeau SN, Lindor NM, Lemarchand L, Gallinger S, Haile RW, Potter JD, Hopper JL, Jass JR; Colon Cancer Family Registry. Pathology features in Bethesda guidelines predict colorectal cancer microsatellite instability: a population-based study. *Gastroenterology.* 2007;133(1):48-56.
61. Truta B, Chen YY, Blanco AM, Deng G, Conrad PG, Kim YH, Park ET, Kakar S, Kim YS, Velayos F, Sleisenger MH, Terdiman JP. Tumor histology helps to identify Lynch syndrome among colorectal cancer patients. *Fam Cancer.* 2008;7(3):267-74.
62. Koehler-Santos P, Izetti P, Abud J, Pitroski CE, Cossio SL, Camey SA, Tarta C, Damin DC, Contu PC, Rosito MA, Ashton-Prolla P, Prolla JC. Identification of patients at-risk for Lynch syndrome in a hospital-based colorectal surgery clinic. *World J Gastroenterol.* 2011;17(6):766-73.
63. Wright CL, Stewart ID. Histopathology and mismatch repair status of 458 consecutive colorectal carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2003;27(11):1393-406.
64. Jass JR. HNPCC and sporadic MSI-H colorectal cancer: a review of the morphological similarities and differences. *Fam Cancer.* 2004;3(2):93-100.

-
65. Burgart LJ. Testing for defective DNA mismatch repair in colorectal carcinoma: a practical guide. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129(11):1385-9.
66. Kakar S, Aksoy S, Burgart LJ, Smyrk TC. Mucinous carcinoma of the colon: correlation of loss of mismatch repair enzymes with clinicopathologic features and survival. *Mod Pathol*. 2004;17(6):696-700.
67. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol*. 2005;16(3):481-8.
68. Lichtenstein P, Holm NV, Verkasalo PK, Iliadou A, Kaprio J, Koskenvuo M, Pukkala E, Skytthe A, Hemminki K. Environmental and heritable factors in the causation of cancer-analyses of cohorts of twins from Sweden, Denmark, and Finland. *N Engl J Med*. 2000;343(2):78-85.
69. Jaspersion KW, Tuohy TM, Neklason DW, Burt RW. Hereditary and familial colon cancer. *Gastroenterology*. 2010;138(6):2044-58.
70. Johns LE, Houlston RS. A systematic review and metaanalysis of familial colorectal cancer risk. *Am J Gastroenterol*. 2001;96(10):2992-3003.
71. Llor X, Pons E, Xicola R, Castells A, Alenda C, Piñol V, Andreu M, Castellví-Bel S, Payá A, Jover R, Bessa X, Girós A, Roca A, Gassull MA. Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam Criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res*. 2005;11(20):7304-10.
72. Cahill DP, Lengauer C, Yu J, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz SD, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature*. 1998;392(6673):300-3.
73. Lamberti C, Kruse R, Ruelfs C, Caspari R, Wang Y, Jungck M, Mathiak M, Malayeri HR, Friedl W, Sauerbruch T, Propping P. Microsatellite instability:

a useful diagnostic tool to select patients at high risk for hereditary non-polyposis colorectal cancer - a study in different groups of patients with colorectal cancer. *Gut*. 1999;44(6):839-43.

74. Samowitz WS, Curtin K, Lin HH, Robertson MA, Schaffer D, Nichols M, Gruenthal K, Leppert MF, Slattery ML. The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterology*. 2001;121(4):830-8.
75. Lindor N, Rabe K, Petersen G, Haile R, Casey G, Baron J, Gallinger S, Bapat B, Aronson M, Hopper J, Jass J, LeMarchand L, Grove J, Potter J, Newcomb P, Terdiman JP, Conrad P, Moslein G, Goldberg R, Ziogas A, Anton-Culver H, de Andrade M, Siegmund K, Thibodeau SN, Boardman LA, Seminara D. Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency (Familial Colorectal Cancer Type X). *JAMA*. 2005;293(16):1979-85.
76. Weissman SM, Bellcross C, Bitner CC, Freivogel ME, Haidle JL, Kaurah P, Leininger A, Palaniappan S, Steenblock K, Vu TM, Daniels MS. Genetic counseling considerations in the evaluation of families for Lynch syndrome- a review. *J Genet Couns*. 2011;20(1):5-19.
77. Hampel H, Frankel W, Panescu J, Lockman J, Sotamaa K, Fix D, Comeras I, La Jeunesse J, Nakagawa H, Westman JA, Prior TW, Clendenning M, Penzone P, Lombardi J, Dunn P, Cohn DE, Copeland L, Eaton L, Fowler J, Lewandowski G, Vaccarello L, Bell J, Reid G, de la Chapelle A. Screening for Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) among endometrial cancer patients. *Cancer Res*. 2006;66(15):7810-7.
78. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Jass JR, Green JS, Nomizu T, Müller H, Lynch HT. The epidemiology of endometrial cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1994;14(4B):1675-8.

-
79. Hampel H, Stephens JA, Pukkala E, Sankila R, Aaltonen LA, Mecklin JP, de la Chapelle A. Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome later age of onset. *Gastroenterology*. 2005;129(2):415-21.
80. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, Mecklin JP. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology*. 1996;110(3):682-7.
81. Albano WA, Recabaren JA, Lynch HT, Campbell AS, Mailliard JA, Organ CH, Lynch JF, Kimberling WJ. Natural history of hereditary cancer of the breast and colon. *Cancer*. 1982;50(2):360-3.
82. Lynch HT, Harris RE, Lynch PM, Guirgis HA, Lynch JF, Bardawil WA. Role of heredity in multiple primary cancer. *Cancer*. 1977;40(4 Suppl):1849-54.
83. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to nonpolyposis colorectal cancer. *J Med Genet*. 1999;36(11):801-18.
84. Mecklin JP, Jarvinen HJ. Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum*. 1986;29(3):160-4.
85. Bellizzi AM, Frankel WL. Colorectal cancer due to deficiency in DNA mismatch repair function: a review. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(6):405-17.
86. Klarskov L, Holck S, Bernstein I, Okkels H, Rambech E, Baldetorp B, Nilbert M. Challenges in the identification of MSH6-associated colorectal cancer: rectal location, less typical histology, and a subset with retained mismatch repair function. *Am J Surg Pathol*. 2011;35(9):1391-9.
87. Ferreira S, Lage P, Sousa R, Claro I, Francisco I, Filipe B, Suspiro A, Chaves P, Rodrigues P, Albuquerque C, Nobre Leitão C. Carcinoma colorectal familiar de tipo X caracterização clínica, patológica e molecular. *Acta Med Port*. 2009;22(3):207-14.

-
88. Hendriks YMC, de Young AE, Morreau H, Tops CM, Vasen HF, Wijnen JT, Breuning MH, Bröcker-Vriends AH. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. *CA Cancer J Clin.* 2006;56(4):213-25.
 89. Lynch HT, Lynch JF, Lynch PM. Toward a consensus in molecular diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome). *J Natl Cancer Inst.* 2007;99(4):261-3.
 90. Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part 2. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn.* 2008;10(4):301-7.
 91. Lynch HT, Bronson DR, Weismann S, Coronel SM, Kinarsky Y, Lynch JF, Shaw TG, Rubinstein WS. Hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma (HNPCC) and HNPCC-like families: problems in diagnosis, surveillance, and management. *Cancer.* 2004;100(1):53-64.
 92. Kastrinos F, Syngal S. Screening patients with colorectal cancer for Lynch syndrome: What are we waiting for? *J Clin Oncol.* 2012;30(10):1024-27.
 93. Hampel H. Point: Justification for Lynch syndrome screening among all patients with newly diagnosed colorectal cancer. *J Natl Compr Canc Netw.* 2010;8(5):597-601.
 94. Hall MJ. Counterpoint: Implementing population genetic screening for Lynch syndrome among newly diagnosed colorectal cancer patients-Will the ends justify the means? *J Natl Compr Canc Netw.* 2010;8(5):606-11.
 95. Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med.* 2009;11(1):42-65.

96. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodríguez-Moranta F, Payá A, Jover R, Bessa X; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Accuracy of revised Bethesda guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA*. 2005;293(16):1986-7.
97. Wolf B, Gruber S, Henglmüller S, Kappel S, Bergmann M, Wrba F, Karner-Hanusch J. Efficiency of the revised Bethesda guidelines (2003) for the detection of mutations in mismatch repair genes in Austrian HNPCC patients. *Int J Cancer*. 2006;118(6):1465-70.
98. Rodríguez-Moranta F, Castells A, Andreu M, Piñol V, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Jover R, Payá A, Bessa X, Balaguer F, Cubiella J, Argüello L, Morillas JD, Bujanda L; Gastrointestinal Oncology Group of the Spanish Gastroenterological Association. Clinical performance of original and revised Bethesda guidelines for the identification of MSH2/MLH1 gene carriers in patients with newly diagnosed colorectal cancer: Proposal of a new and simpler set of recommendations. *Am J Gastroenterol*. 2006;101(5):1104-11.
99. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kääriäinen H, Eskelinen M, Järvinen H, Mecklin JP, de la Chapelle A. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med*. 1998;338(21):1481-7.
100. Julié C, Trésallet C, Brouquet A, Vallot C, Zimmermann U, Mitry E, Radvanyi F, Rouleau E, Lidereau R, Coulet F, Olschwang S, Frébourg T, Rougier P, Nordlinger B, Laurent-Puig P, Penna C, Boileau C, Franc B, Muti C, Hofmann-Radvanyi H. Identification in daily practice of patients with Lynch syndrome (Hereditary nonpolyposis colorectal cancer): revised Bethesda guidelines- based approach versus molecular screening. *Am J Gastroenterol*. 2008;103(11):2825-35.

101. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, Kääriäinen H, Ahtola H, Eskelinen M, Härkönen N, Julkunen R, Kangas E, Ojala S, Tulikoura J, Valkamo E, Järvinen H, Mecklin JP, Aaltonen LA, de la Chapelle A. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2000;18(11):2193-200.
102. de la Chapelle A, Palomaki G, Hampel H. Identifying Lynch syndrome. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1492-3.
103. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, Lane MR, Lanspa SJ, Lynch HT. Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res*. 1994;14(48):1631-4.
104. Vasen HF, Mecklin JP, Watson P, Utsunomiya J, Bertario L, Lynch P, Svendsen LB, Cristofaro G, Müller H, Khan PM, et al. Surveillance in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an international cooperative study of 165 families. The International Collaborative Group on HNPCC. *Dis Colon Rectum*. 1993;36(1):1-4.
105. Goecke T, Schulmann K, Engel C, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Schackert HK, Kloor M, Kunstmann E, Vogelsang H, Keller G, Dietmaier W, Mangold E, Friedrichs N, Propping P, Krüger S, Gebert J, Schmiegel W, Rueschoff J, Loeffler M, Moeslein G; German HNPCC Consortium. Genotype-phenotype comparison of German MLH1 and MSH2 mutation carriers clinically affected with Lynch syndrome: a report by the German HNPCC Consortium. *J Clin Oncol*. 2006;24(26):4285-92.
106. Serrano M, Lage P, Belga S, Filipe B, Francico I, Rodrigues P, Fonseca R, Chaves P, Claro I, Albuquerque C, Pereira AD. Bethesda criteria for microsatellite instability testing: impact on the detection of new cases of Lynch syndrome. *Fam Cancer*. 2012;11(4):571-78.
107. Lee HJ, Choi J, Hwang TS, Shong YK, Hong SJ, Gong G. Detection of BRAF mutations in thyroid nodules by allele-specific PCR using a dual priming oligonucleotide system. *Am J Clin Pathol*. 2010;133(5):802-8.

108. Jemal A, Bray F, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 2011;61(2):69-90.
109. Sithamandam G, Kolch W, Duh FM, Rapp UR. Complete coding sequence of a human B-raf cDNA and detection of B-raf protein kinase with isozyme specific antibodies. *Oncogene*. 1990;5(12):1775-80.
110. Sithamandam G, Druck T, Cannizzaro LA, Leuzzi G, Huebner K, Rapp UR. B-raf and a B-raf pseudogene are located on 7q in man. *Oncogene*. 1992;7(4):795-9.
111. Li WQ, Kawakami K, Ruzskiewicz A, Bennett G, Moore J, Iacopetta B. BRAF mutations are associated with distinctive clinical, pathological and molecular features of colorectal cancer independently of microsatellite instability status. *Mol Cancer*. 2006;5:2.
112. Kakar S, Deng G, Sahai V, Matsuzaki K, Tanaka H, Miura S, Kim YS. Clinicopathologic characteristics, CpG island methylator phenotype, and BRAF mutations in microsatellite-stable colorectal cancers without chromosomal instability. *Arch Pathol Lab Med*. 2008;132(6):958-64.
113. Zlobec I, Bihl MP, Schwarb H, Terracciano L, Lugli A. Clinicopathological and protein characterization of BRAF- and K-RAS-mutated colorectal cancer and implications for prognosis. *Int J Cancer*. 2010;127(2):367-80.
114. Di Nicolantonio F, Martini M, Molinari F, Sartore-Bianchi A, Arena S, Saletti P, De Dosso S, Mazzucchelli L, Frattini M, Siena S, Bardelli A. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(35):5705-12.
115. Toon CW, Walsh MD, Chou A, Capper D, Clarkson A, Sioson L, Clarke S, Mead S, Walters RJ, Clendenning M, Rosty C, Young JP, Win AK, Hopper JL, Crook A, von Deimling A, Jenkins MA, Buchanan DD, Gill AJ. BRAFV600E immunohistochemistry facilitates universal screening of colorectal cancers for Lynch syndrome. *Am J Surg Pathol*. 2013;37(10):1592-602.

116. Balaguer F. Genética del cancer colorectal. *Gastroenterol Hepatol*. 2013;36(suppl 2):73-9.
117. Rex DK, Ahnen DJ, Baron JA, Batts KP, Burke CA, Burt RW, Goldblum JR, Guillem JG, Kahi CJ, Kalady MF, O'Brien MJ, Odze RD, Ogino S, Parry S, Snover DC, Torlakovic EE, Wise PE, Young J, Church J. Serrated lesions of the colorectum: review and recommendations from an expert panel. *Am J Gastroenterol*. 2012;107(9):1315-29.
118. Lieberman DA, Rex DK, Winawer SJ, Giardiello FM, Johnson DA, Levin TR, United States Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. Guidelines for colonoscopy surveillance after screening and polypectomy: a consensus update by the US Mult-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2012;143(3):844-57.
119. Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(6):555-61.
120. Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, Toshihiko Nakagawa W, Aguilar S Jr, Monteiro Santos EM, Vierira Costa ML, Lopes A. Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: Na analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer*. 2004;3(1):41-7.
121. Valentin MD, da Silva FC, dos Santos EM, Lisboa BG, de Oliveira LP, Ferreira F de O, Gomy I, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Redal M, Vaccaro C, Valle AD, Sarroca C, Carraro DM, Rossi BM. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated South American suspected Lynch syndrome individuals. *Fam Cancer*. 2011;10(4):641-7

122. Balaguer F, Castells A. Hyperplastic polyps: are they completely innocent? *Curr Colorectal Cancer Rep.* 2011;7(1):42-9.
123. O'Brien MJ. Hyperplastic and serrated polyps of the colorectum. *Gastroenterol Clin North Am.* 2007;36(4):947-68.
124. Carballal S, Moreira L, Balaguer F. Serrated polyps and serrated polyposis syndrome. *Cir Esp.* 2013;91(3):141-8.
125. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 2009;41(1):112-17.
126. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E. Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 2009;30(2):197-203.
127. Grover S, Syngal S. Risk assessment, genetic testing, and management of Lynch syndrome. *J Natl Compr Canc Netw* 2010;8(1):98-105.
128. Wijnen JT, Vasen HF, Khan PM, Zwinderman AH, van der Klift H, Mulder A, Tops C, Moller P, Fodde R. Clinical findings with implications for genetic testing in families with clustering of colorectal cancer. *N Engl J Med.* 1998; 339(8):511-18.
129. Lipton LR, Johnson V, Cummings C, Fisher S, Risby P, Eftekhari Sadat AT, Cranston T, Izatt L, Sasieni P, Hodgson SV, Thomas HJ, Tomlinson IP. Refining the Amsterdam Criteria and Bethesda Guidelines: testing algorithms for the prediction of mismatch repair mutation status in the familial cancer clinic. *J Clin Oncol.* 2004;22(24):4934-43.

-
130. Barnetson RA, Teresa A, Farrington SM, Nicholl ID, Cetnarskyj R, Porteous ME, Campbell H, Dunlop MG. Identification and survival of carriers of mutations in DNA mismatch-repair genes in colon cancer. *N Engl J Med*. 2006;354(26):2751-63.
131. Chen S, Wang W, Lee S, Nafa K, Lee J, Romans K, Watson P, Gruber SB, Euhus D, Kinzler KW, Jass J, Gallinger S, Lindor NM, Casey G, Ellis N, Giardiello FM, Offit K, Parmigiani G; Colon Cancer Family Registry. Prediction of germline mutations and cancer risk in the Lynch syndrome. *JAMA*. 2006;296(12):1479-87.
132. Balmaña J, Stockwell DH, Steyerberg EW, Stoffel EM, Deffenbaugh AM, Reid JE, Ward B, Scholl T, Hendrickson B, Tazelaar J, Burbidge LA, Syngal S. Prediction of MLH1 and MSH2 mutations in Lynch syndrome. *JAMA*. 2006;296(12):1469-78.
133. Kastrinos F, Steyerberg EW, Mercado R, Balmaña J, Holter S, Gallinger S, Siegmund KD, Church JM, Jenkins MA, Lindor NM, THibodeau SN, Burbidge LA, Wenstrup RJ, Syngal S. The PREMM (1,2,6) model predicts risk of MLH1, MSH2, and MSH6 germline mutations based on cancer history. *Gastroenterology*. 2011;140(1):73-81.
134. Tenesa A, Farrington SM, Prendergast JG, Porteous ME, Walker M, Haq N, Barnetson RA, Theodoratou E, Cetnarskyj R, Cartwright N, Semple C, Clark AJ, Reid FJ, Smith LA, Kavoussanakis K, Koessler T, Pharoah PD, Buch S, Schafmayer C, Teipel J, Schreiber S, Völzke H, Schmidt CO, Hampe J, Chang-Claude J, Hoffmeister M, Brenner H, Wilkening S, Canzian F, Capella G, Moreno V, Deary IJ, Starr JM, Tomlinson IP, Kemp Z, Howarth K, Carvajal-Carmona L, Webb E, Broderick P, Vijayakrishnan J, Houlston RS, Rennert G, Ballinger D, Rozek L, Gruber SB, Matsuda K, Kidokoro T, Nakamura Y, Zanke BW, Greenwood CM, Rangrej J, Kustra R, Montpetit A, Hudson TJ, Gallinger S, Campbell H, Dunlop MG. Genome-wide association scan identifies a colorectal cancer susceptibility locus on 11q23 and replicates risk loci at 8q24 and 18q21. *Nat Genet*. 2008;40(5):631-37.

135. Tomlinson IP, Webb E, Carvajal-Carmona L, Broderick P, Howarth K, Pittman AM, Spain S, Lubbe S, Walther A, Sullivan K, Jaeger E, Fielding S, Rowan A, Vijayakrishnan J, Domingo E, Chandler I, Kemp Z, Qureshi M, Farrington SM, Tenesa A, Prendergast JG, Barnetson RA, Penegar S, Barclay E, Wood W, Martin L, Gorman M, Thomas H, Peto J, Bishop DT, Gray R, Maher ER, Lucassen A, Kerr D, Evans DG; CORGI Consortium, Schafmayer C, Buch S, Völzke H, Hampe J, Schreiber S, John U, Koessler T, Pharoah P, van Wezel T, Morreau H, Wijnen JT, Hopper JL, Southey MC, Giles GG, Severi G, Castellví-Bel S, Ruiz-Ponte C, Carracedo A, Castells A; EPICOLON Consortium, Försti A, Hemminki K, Vodicka P, Naccarati A, Lipton L, Ho JW, Cheng KK, Sham PC, Luk J, Agúndez JA, Ladero JM, de la Hoya M, Caldés T, Niittymäki I, Tuupanen S, Karhu A, Aaltonen L, Cazier JB, Campbell H, Dunlop MG, Houlston RS. CORG Consortium; EPICOLON Consortium. A genome-wide association study identifies colorectal cancer susceptibility loci on chromosomes 10p14 and 8q23.3. *Nat Genet.* 2008;40(30):623-30.
136. Grover S, Stoffel EM, Mercado RC, Ford BM, Kohlman WK, Shannon KM, Conrad PG, Blanco AM, Terdiman JP, Gruber SB, Chung DC, Syngal S. Colorectal cancer risk perception on the basis of genetic test results in individuals at risk for Lynch syndrome. *J Clin Oncol.* 2009;27(24):3981-6.
137. Manders P, Spruijt L, Kets CM, Willems HW, Bodmer D, Hebeda KM, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N. Young age and a positive family history of colorectal cancer are complementary selection criteria for the identification of Lynch syndrome. *Eur J Cancer.* 2011;47(9):1407-13.
138. Church J, McGannon E. Family history of colorectal cancer: how often and how accurately it is recorded? *Dis Colon Rectum.* 2000;43(11):1540-4.
139. Grover S, Stoffel EM, Bussone L, Tschoegl E, Syngal S. Physician assessment of family cancer history and referral for genetic evaluation in colorectal cancer patients. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2004;2(9):813-19.

-
140. Sijmons RH, Boonstra AE, Reethuis J, Hordijk-Hos JM, de Walle HE, Oosterwijk JC, Cornel MC. Accuracy of family history of cancer: clinical genetic implications. *Eur J Hum Genet*. 2000;8(3):181-6.
141. Alexander J, Watababe T, Wu T-T, Rashid A, Li S, Hamilton SR. Histopathological identification of colon cancer with microsatellite instability. *Am J Pathol*. 2001;158(2):527-35.
142. Musulén E, Sanz C, Muñoz-Mármol Am, Ariza A. Mismatch repair protein immunohistochemistry: a useful population screening strategy for Lynch syndrome. *Hum Pathol*; 2014;45(7):1388-96.
143. Efron B. Estimating the error rate of a prediction rule: improvement on cross-validation. *J Am Stat Assoc*. 1983;78(382):316-31.
144. Youden WJ. Index for rating diagnostic tests. *Cancer*. 1950;3(1):32-5.
145. Burnham Kenneth P and Anderson David R. *Model selection and multi-model inference: a practical information-theoretic approach*. New York: Springer; 2002.
146. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol*. 2012;3(3):153-73.