BENEDITO MAURO ROSSI

**Contribuição para o estudo do câncer colorretal com
predisposição hereditária no Brasil**

**Tese apresentada à Faculdade de Medicina
da Universidade de São Paulo para obtenção
do título de Professor Livre-Docente junto
ao Departamento de Radiologia (Disciplina
de Oncologia)**

São Paulo

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Rossi, Benedito Mauro

Contribuição para o estudo do câncer colorretal com predisposição hereditária
no Brasil / Benedito Mauro Rossi. -- São Paulo, 2008.

Tese(livre-docência)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Departamento de Radiologia. Disciplina de Oncologia.

Descritores: 1.Neoplasias colorretais hereditárias sem polipose 2.Polipose
adenomatosa colo 3.Predisposição genética para doença

USP/FM/SBD-314/08

DEDICATÓRIA

Para Aglael.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais.

Aos pacientes.

A todos aqueles que
contribuíram, de alguma
maneira, para que este
trabalho pudesse ser realizado.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas

Lista de tabelas

Lista de figuras

Lista de quadros

Resumo

Summary

O câncer colorretal com predisposição hereditária	1
Contribuição para o estudo do câncer colorretal hereditário no Brasil	28
Conclusão	126
Referências	128

Anexos

- 1- Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, Epelman C, Paegle LD, Nakagawa WT, Borges AY, Duarte APM. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. South American Journal of Cancer 1997;1:191-7.
- 2- Rossi BM, Pinho MSL, Nakagawa WT, Johnson LFP, Lopes A. Tumores colorretais hereditários. Rev Col Bras Cir 1998;25:271-80.
- 3- Corvello CM, Bevilacqua RAU, Rossi BM, Simpson AJG. A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large Brazilian kindred. Human Mutation 1999;13:506-8.

- 4- 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*. 2002a Jul;9(6):555-61.
- 5- Rossi BM, Ferreira FO, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Rocha JCC, Lopes A. Câncer colorretal hereditário sem polipose. *Acta Oncológica Brasileira* 2002b;22:238-44.
- 6- 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: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer*. 2004;3(1):41-7.
- 7- Carvalho F, Santos EMM, Pena SD, Vettore AL, Lopes A, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Rossi BM. Clinicopathological significance of BAT26 instability in 184 patients with colorectal cancer. *Applied Cancer Res* 2005;25:36-40.
- 8- Anacleto C, Rossi B, Lopes A, Soares FA, Rocha JC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJ, Pena SD. Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. *Oncol Rep*. 2005a Feb;13(2):325-8.
- 9- Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJ, Pena SD. Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? *Neoplasia*. 2005b Apr;7(4):331-5.

- 10- Clarizia AD, Bastos-Rodrigues L, Pena HB, Anacleto C, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo A, Simpson AJ, Pena SD. Relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with microsatellite instability and promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancer. *Genet Mol Res.* 2006 Jun 30;5(2):315-22.
- 11- Park JG, Kim DW, Hong CW, Nam BH, Shin YK, Hong SH, Kim IJ, Lim SB, Aronson M, Bisgaard ML, Brown GJ, Burn J, Chow E, Conrad P, Douglas F, Dunlop M, Ford J, Greenblatt MS, Heikki J, Heinimann K, Lynch EL, Macrae F, McKinnon WC, Möeslein G, Rossi BM, Rozen P, Schofield L, Vaccaro C, Vasen H, Velthuisen M, Viel A, Wijnen J; International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours. Germ line mutations of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients with small bowel cancer: International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Collaborative Study. *Clin Cancer Res.* 2006 Jun 1;12(11 Pt 1):3389-93.
- 12- Dominguez MV, Bastos EP, Santos EM, Oliveira LP, Ferreira FO, Carraro DM, Rossi BM. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian Lynch syndrome families. *Int J Colorectal Dis.* 2008 Jul 2. [Epub ahead of print]

LISTA DE ABREVIATURAS

A	adenina
AFAP	polipose adenomatosa familiar atenuada
AFC	agregação familiar de câncer
C	citossina
CCF	câncer colorretal familiar
CCR	câncer colorretal
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	ácido desoxirribonucleico
FAP	polipose adenomatosa familiar
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
G	guanina
GBETH	Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários
GETH	Grupo de Estudos de Tumores Hereditários
GPCCR	Grupo de Pesquisas em Câncer Colorretal
HNPCC	câncer colorretal hereditário sem polipose
IMC	índice de massa corporal
INSIGHT	International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours
LFL	<i>Li-Fraumeni Like</i>
MSI	instabilidade de microssatélites
MSI-H	alta instabilidade de microssatélites

MSI-L	baixa instabilidade de microssatélites
MSS	estabilidade de microssatélites
MTHFR	<i>methylenetetrahydrofolatereductase</i>
NBI	<i>Narrow Band Imaging</i>
NO	óxido nítrico
NOS	sintase do óxido nítrico
PCR	reação em cadeia da polimerase
PIBIC	Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica
RCCH	Registro de Câncer Colorretal Hereditário
RNA	ácido ribonucleico
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase em tempo real
SLF	síndrome de Li-Fraumeni
SL	syndrome de Lynch
SNC	sistema nervoso central
T	timina
TNM	tumor, linfonodo, metástase
UC	colite ulcerativa

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Pacientes cadastrados no registro CCRH, até maio de 2008, de acordo com os antecedentes familiares de câncer.	31
Tabela 2	Características clínicas dos pacientes.	48
Tabela 3	Características da evolução pós-operatória dos pacientes.	49
Tabela 4	Expressão das mucinas comparativamente no íleo, cólon e bolsa ileal.	51
Tabela 5	Resultados da imunoistoquímica, de marcadores selecionados, em análise comparativa entre as amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.	56
Tabela 6	Expressão das PKC's no tecido linfóide nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.	59
Tabela 7	Expressão das PKC's nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.	60
Tabela 8	Expressão imunoistoquímica das principais proteínas de reparo em 95 casos com suspeita de SL, pelos critérios de Amsterdam ou Bethesda.	91
Tabela 9	Correlação dos resultados da imunoistoquímica com os antecedentes familiares de 95 pacientes com suspeita de SL.	94
Tabela 10	Correlação entre a localização do tumor no cólon e os resultados da imunoistoquímica das proteínas de reparo.	94
Tabela 11	Correlação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e a presença de mais de um tumor primário no mesmo indivíduo.	95
Tabela 12	Correlação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e o estadiamento T.	96

Tabela 13	Correlação entre o subtipo histológico e as alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.	97
Tabela 14	Correlação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo e a número médio de tumores, por localização, nas famílias dos pacientes estudados.	97
Tabela 15	Número de marcadores de MSI alterados por paciente e sua correlação com a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo.	98
Tabela 16	Descrição do número de famílias estudadas, com relação aos genes <i>MSH2</i> e <i>MLH1</i> , de acordo com critérios de risco de hereditariedade.	100
Tabela 17	Mutações encontradas no genes <i>MLH1</i> e <i>MSH2</i> , de acordo com o critério de risco de hereditariedade.	101

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Símbolo do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, criado em 1992.	29
Figura 2	Padronização de símbolos usados nos heredogramas de famílias com CCR hereditário.	33
Figura 3A	Heredograma - família M.	34
3B	Mutação identificada - família M.	34
Figura 4	Heredograma - família D.	35
Figura 5	Heredograma – família T.	36
Figura 6	Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento parcial das vilosidades, aumento de 10x.	50
Figura 7	Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento total das vilosidades, aumento de 10x.	50
Figura 8	Estudo imunoistoquímico de tecido de bolsa ileal.	52
Figura 9	Estudo imunoistoquímico para a proteína beta-catenina.	53
Figura 10	Imunoistoquímica para APC.	55
Figura 11	Imunoistoquímica, com marcadores selecionados, de tecido de bolsa ileal.	57
Figura 12	Imunoistoquímica das PKC's, em tecidos selecionados.	58
Figura 13	Imunoistoquímica da PKC delta, em tecidos selecionados.	62
Figura 14	Heredograma da família C, com vários casos de CCR, em 3 gerações, incluindo um casamento co-sangüíneo entre primos (probando).	69

Figura 15	Heredograma da família A, com 3 gerações, sendo que a segunda, teve seus quatro membros estudados, três deles portadores da predisposição e com CCR.	70
Figura 16	Resultados da publicação realizada em 2002, sobre síndrome de Lynch, em famílias brasileiras.	72
Figura 17A	Número de tumores colorretais e extracolônicos encontrados.	74
17B	Número de tumores extracolônicos encontrados nas famílias classificadas pelos critérios de Amsterdam como síndrome de Lynch.	75
17C	Número de tumores extracolônicos encontrados nas famílias classificadas como CCR familiar (CCF - critérios de Amsterdam menos um).	76
Figura 18A	Demonstrativo do movimento de acessos ao <i>site</i> do GETH em julho de 2008.	78
18B	Demonstrativo dos conteúdos mais acessados.	78
Figura 19A	Correlação entre variáveis clínicas e instabilidade de BAT26.	82
19B	Correlação entre variáveis patológicas e instabilidade de BAT26.	83
Figura 20	Correlação da metilação de <i>MLH1</i> e MSI com a localização proximal do CCR no cólon.	84
Figura 21	Frequência dos polimorfismos da MTHFR em pacientes portadores de CCR e controles saudáveis.	86
Figura 22A 22B	Correlação entre polimorfismos de MTHFR e características clínicas e metilação aberrantes dos genes estudados.	86
Figura 23	Associação entre polimorfismos da MTHFR e MSI em pacientes com CCR.	87
Figura 24	Fotos exemplificando a expressão imunoistoquímica dos heterodímeros MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6.	92

Figura 25A	Tela de acesso ao Sistema de dados, com identificação e senha.	108
25B	Tela de identificação do programa, que está em fase final de desenvolvimento.	109
25C	Tela de construção e edição de famílias.	109
25D	Exemplo de heredograma produzido pelo programa.	110
25E	Tela de identificação de indivíduos para acesso às fichas de dados.	111
25F	Tela com ficha de dados gerais do paciente.	111
25G	Tela com ficha de dados contendo características do paciente.	112
25H	Tela com orientações para acesso ao tutorial.	112
Figura 26	Fluxograma resumindo os objetivos dos projetos de pesquisa sobre possíveis causas de predisposição ao CCR hereditário.	114
Figura 27	Fluxograma resumindo os objetivos dos projetos de pesquisa sobre possíveis causas de predisposição ao CCR hereditário.	120

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico da SL.	10
Quadro 2	Critérios de Bethesda para o rastreamento de indivíduos suspeitos de SL.	11
Quadro 3	Critérios de Amsterdam II para o diagnóstico clínico de SL.	12
Quadro 4	Critérios de Bethesda revisados, visando à identificação de indivíduos candidatos aos testes de rastreamento para a SL.	12

RESUMO

Rossi BM. **Contribuição para o estudo do câncer colorretal com predisposição hereditária no Brasil.** [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 154p.

Introdução: O número de novos casos de câncer colorretal (CCR) no Brasil tem aumentado ano a ano, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer. Na região sudeste do país, este é o segundo tumor mais freqüente em homens e mulheres, depois de câncer de próstata e de mama, respectivamente. Cerca de 5% dos pacientes com CCR apresentam características hereditárias, podendo ser caracterizados como pertencentes a famílias com síndromes típicas. As duas principais síndromes típicas são: câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), ou síndrome de Lynch (SL), e a polipose adenomatosa familiar (FAP). Além das síndromes típicas, bem estabelecidas, há um subgrupo, que corresponde aproximadamente a 20% a 30% dos casos de CCR, que apresenta suspeita de predisposição hereditária. Neste subgrupo, temos as agregações familiares de câncer e os casos com diagnóstico de câncer em idade precoce. As causas das prováveis predisposições nesses pacientes não são conhecidas. Assim sendo, o CCR com predisposição hereditária pode ocorrer em até um terço dos casos, o que torna imperativo o desenvolvimento de estudos na Área. **Material e Métodos:** Revisamos nossa contribuição para o estudo do CCR com predisposição hereditária no Brasil, realizando uma compilação das atividades, publicações de artigos e livros, e projetos de pesquisa. **Resultados:** Criamos o Registro de Câncer Colorretal Hereditário (RCCH) do Hospital A.C.Camargo, em São Paulo, em 1992, atualmente com mais de 300 famílias registradas e seguidas. Em

1994, foi identificada a primeira mutação no gene *APC*, em uma família brasileira com FAP, tendo sido esta mutação publicada em 1997. No final da década de 1990, foi realizado um estudo com 25 famílias brasileiras pertencentes ao RCCH, com suspeita de diagnóstico de SL. Foram identificadas 10 mutações (10/25 - 40%) nos genes de reparo *MLH1* e *MSH2*. Este constituiu um trabalho pioneiro no Brasil, publicado em 2002. Em 2003, fundamos o Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários (GBETH), do qual sou o atual presidente. Foram organizados quatro livros, a saber: um sobre CCR, com uma seção exclusiva dedicada à predisposição hereditária à doença; dois sobre tumores hereditários em geral, incluindo, principalmente, CCR; e um sobre genética básica do câncer. Em 2006, demos início a dois projetos de pesquisa, financiados pela FAPESP, visando ao estudo da predisposição hereditária ao CCR (FAP e SL). Tais projetos estão em fase de conclusão e seus resultados preliminares são apresentados. Elaboramos, também, em 2006, um projeto financiado pelo CNPq, que visa ao estudo de pacientes com suspeita de predisposição hereditária ao CCR, incluindo o desenvolvimento de um registro eletrônico de famílias. **Conclusão:** O percurso apresentado demonstra que, nos últimos 16 anos, temos participado e contribuído ativamente para o estudo e o desenvolvimento de pesquisas em CCR com predisposição hereditária no Brasil. As perspectivas são de continuidade desta linha de pesquisa para os próximos anos.

DESCRITORES: neoplasias colorretais hereditárias sem polipose, polipose adenomatosa do colo, predisposição genética para a doença.

SUMMARY

Rossi BM. **[A contribution to the study of colorectal cancer with hereditary predisposition in Brazil]**. [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008. 154p.

Introduction: The number of new cases of colorectal cancer (CCR) in Brazil has been increasing in the last years, according to Instituto Nacional do Câncer. In the Southeastern region of the country, it is the second most frequent tumor in men and women, after breast and prostate cancer, respectively. About 5% of all patients with CCR have hereditary characteristics, fulfilling criteria for typical syndromes. The two main typical syndromes are hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), or Lynch syndrome (SL), and familial adenomatous polyposis (FAP). Beyond the typical syndromes, well established, a sub-group of about 20% to 30% of patients still exists that has characteristics leading to the suspicion of CCR with hereditary predisposition, namely, familial aggregation of cancer or diagnosis of CCR at an early age. However, the probable causes of predispositions in this sub-group of patients are not known. Thus, as hereditary predisposition to CCR can occur in up to a third of the cases, the development of studies in this area is imperative. **Material and methods:** A review of our contribution to the study of CCR with hereditary predisposition in Brazil, by means of a compilation of the activities in the area, publications of articles and books, and research projects. **Results:** Initially, contributing to the creation of the Hereditary Colorectal Cancer Registry (RCCH) of A.C.Camargo Hospital, in São Paulo, in 1992, currently with more than 300 registered and followed families. In 1994, with the identification of the first mutation in the *APC* gene in a Brazilian family with FAP,

published in 1997. More than two families with FAP had mutations identified in the *APC* gene in the following years. At the end of the decade of 1990, with the study of 25 Brazilian families registered in RCCH, with suspicion of HNPCC, and the identification of 10 mutations (10/25 - 40%) in the *MLH1* and *MSH2* mismatch repair genes, also a pioneering work in Brazil, published in 2002. Other contribution came in 2003, with the foundation of the Brazilian Study Group on Hereditary Tumors (GBETH) which I preside since then. The organization of four books, one on CCR that contains a section approaching specifically the hereditary predisposition to the disease, two on hereditary tumors in general, mainly CCR, and other on basic cancer genetics. In 2006, with the coordination of two research projects, supported by FAPESP, aiming at the study of the hereditary predisposition to CCR (FAP and HNPCC). These latter are in their concluding phase and the preliminary results are presented here. The participation in a project supported by CNPq with two main objectives: the study of the sub-group of patients with suspicion of hereditary CCR and the development of an electronic registry of families, together with a relational database. **Conclusion:** We have actively participated in the study and development of research of CCR with hereditary predisposition in the last 16 years in the Brazilian context. The perspectives are for the continuity of this line of research in the next years.

DESCRIPTORS: Colorectal neoplasms, Hereditary nonpolyposis, Familial adenomatous polyposis, Genetic predisposition to the disease.

O câncer colorretal com predisposição hereditária

Os tumores, de modo geral, resultam da quebra da integridade funcional do ciclo celular, por ação de diversos estímulos. Identificar tais alterações pode ser útil na elaboração do diagnóstico precoce, na determinação de fatores prognósticos, e na abordagem terapêutica (LIU e BODMER 2005). Diante de tal perspectiva, o papel do cirurgião não se restringe à realização de biópsias e de ressecções, mas abrange uma participação conjunta com outros profissionais, como médicos de diversas especialidades e pesquisadores, para possibilitar o diagnóstico molecular e clínico, com vistas ao benefício do paciente.

O câncer é resultado de um processo de múltiplas etapas, nas quais ocorrem alterações genéticas que levam ao surgimento de um clone de células com vantagens proliferativas sobre as demais. Com isso, a arquitetura normal dos tecidos é modificada, levando progressivamente a disfunções (CHAMMAS e NOWAK 2005). Todas as células existem sob estrita regulação de sinais para: controle de crescimento, apoptose, diferenciação, interação célula-célula, e interação célula-matriz extracelular. Os eventos genéticos envolvidos na tumorigênese resultam da ativação de oncogenes e da inativação de genes supressores de tumor, o que permite que as células normais escapem de sua regulação (LIU e BODMER 2005).

O câncer colorretal (CCR) é uma das causas mais freqüentes de morte por câncer nos países industrializados, tanto em homens como em mulheres, com uma incidência anual de 800.000 novos casos no mundo, representando 8,5% do total de tumores (GATALICA e TORLAKOVIC 2008). Em 2008, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (Ministério da Saúde 2007), o Brasil deve chegar a 26.990 novos casos de CCR. Na cidade de São Paulo, este é o segundo tumor mais freqüente em homens e mulheres, depois de câncer de próstata e de mama, respectivamente. A maior incidência ocorre na faixa etária entre 50 e 70 anos, mas as possibilidades de desenvolvimento aumentam a partir dos 40 anos.

Mais recentemente, a incidência de CCR tem aumentado em áreas antes consideradas de baixo risco. Acredita-se que isso se deva ao envelhecimento da população, à adoção de estilos de vida com tendência mais sedentária e a um aumento na preferência e aceitação de dietas pouco saudáveis (FRANCO e FRANCO 2005).

As síndromes familiares típicas são responsáveis por cerca de 6% dos casos de CCR (FEARNHEAD et al. 2002). As principais síndromes hereditárias de predisposição relacionadas ao CCR são: a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), responsável por menos de 1% dos casos, e o Câncer Colorretal Hereditário sem Polipose (HNPCC -

Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer), ou Síndrome de Lynch (SL), responsável por cerca de 5% dos casos (LYNCH et al. 2005).

Outras síndromes podem também estar relacionadas ao CCR. MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) publicaram um interessante estudo sobre famílias com vários casos de CCR e câncer de mama. Os indivíduos foram testados para os genes *BRCA1* e *BRCA2*, responsáveis pela síndrome hereditária de câncer de mama-ovário, e para os genes de reparo relacionados ao HNPCC. No grupo sem mutações identificadas nesses genes, mas com fenótipo familiar de câncer de mama e câncer de cólon, houve significativo aumento da incidência da mutação *CHEK2* 1100delC (18,2% - $p < 0,01$), em relação às famílias sem o aquele fenótipo. Com base neste achado, os autores sugerem que a mutação descrita esteja associada a uma nova síndrome hereditária de predisposição ao câncer denominada mama-cólon.

Da mesma maneira, é preciso considerar o diagnóstico da Síndrome de Li-Fraumeni (SLF), rara, causada por mutações no gene *TP53*. É transmitida de forma autossômica dominante, com risco aumentado de desenvolver tumores em idade jovem. A SLF tem alta penetrância, e estima-se que pacientes que apresentam a síndrome, ou sua variante, Li-Fraumeni Like (LFL), têm risco de 50% de desenvolver tumores antes dos 40 anos de idade, quando

comparados a 1% da população em geral (ACHATZ et al. 2007). Além disso, 90% dos portadores desenvolvem câncer até 60 anos de idade (BIRCH et al. 2001). Inicialmente, a SLF era caracterizada, principalmente, por: osteossarcomas, sarcomas de partes moles, câncer de mama em mulheres na pré-menopausa, tumores cerebrais, tumores adrenocorticais, e leucemias agudas. Hoje, considera-se também que outros tumores fazem parte da síndrome, tais como CCR, câncer de estômago e pulmão, melanoma, e tumores de células germinativas.

Frente à alta incidência de câncer de mama na SLF, em idade jovem, deve-se considerar o diagnóstico diferencial com a síndrome hereditária de câncer de mama-ovário. WONG et al. (2006) relatam alta incidência de CCR em pacientes jovens com SLF. Portanto, o diagnóstico diferencial entre SLF, de um lado, e HNPCC e FAP atenuada, de outro, deve ser feito.

Há uma sobreposição de fenótipos para algumas das diferentes síndromes de predisposição hereditária ao câncer. O CCR é um exemplo disso, pois está presente em diferentes critérios diagnósticos. Assim, o diagnóstico clínico de uma determinada predisposição pode ser difícil, necessitando, muitas vezes, do auxílio do diagnóstico molecular. Nesse contexto, é fundamental a participação de diferentes profissionais com conhecimento na Área, visando ao manejo adequado dos pacientes e de suas famílias.

Além das síndromes típicas, há um subgrupo de famílias com diagnóstico de vários casos de câncer, o qual não se caracteriza de forma conhecida e estabelecida. São as chamadas agregações familiares, que representam entre 20% e 25% do total dos casos de CCR (LYNCH et al. 2005). Nesse subgrupo de famílias, é encontrada uma associação entre fatores ambientais e genéticos ainda pouco esclarecidos, incluindo polimorfismos específicos e mutações em genes modificadores de risco (ROCHA 2005). Portanto, o estudo de tais famílias adquire importância, devendo ser explorado em novas pesquisas, uma vez que ainda é muito pouco estudado.

Polipose Adenomatosa Familiar (FAP)

A FAP representa menos de 1% dos tumores colorretais, acometendo igualmente homens e mulheres. É uma doença autossômica dominante, rara, com penetrância de praticamente 100%, ocasionada por mutações germinativas no gene supressor de tumor *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), que está localizado no braço longo do cromossomo 5. Na grande maioria dos casos, as alterações localizam-se no éxon 15, ocasionando proteínas truncadas e não-funcionais. Ao ocorrer, então, uma segunda mutação, agora somática, no segundo alelo do gene, inicia-se o processo de desenvolvimento de adenomas, e, conseqüentemente, a progressão para carcinoma. Em se tratando de CCR esporádico, as mutações

somáticas do gene *APC* são encontradas em 80% dos casos, e estão envolvidas na iniciação da tumorigênese (CHURCH e FAZIO 2005; PINHO e ROSSI 1999).

A expressão fenotípica dos pacientes com FAP clássica inclui o desenvolvimento de mais de 100 adenomas colorretais, chegando até aos milhares. O aparecimento dos pólipos ocorre durante a segunda década de vida, porém, estes podem surgir em idades mais precoces. O número e o tamanho dos pólipos aumentam com o tempo e têm uma ligeira predisposição pelo lado esquerdo do cólon. Os pacientes podem apresentar diarreia, sangramento gastrointestinal e dor abdominal, mas a grande maioria é assintomática até que o tumor se desenvolva. Os adenomas colônicos dos pacientes com FAP são endoscópica e histologicamente idênticos aos adenomas esporádicos, porém, devido ao grande número e ao aparecimento precoce de lesões, o câncer desenvolve-se mais rapidamente (BÜLOW et al. 2006; JASS 2008).

Os tumores desmóides, que ocorrem em 10% dos pacientes com FAP, são geralmente intra-abdominais e localmente agressivos, apesar de não causarem metástases, constituindo a segunda causa de morte nos pacientes, após o CCR. Outra manifestação extracolônica é a presença de pólipos no trato gastrointestinal superior, sendo que as localizações duodenais e periampulares são as mais freqüentes e de maior risco para transformação maligna. Os

osteomas também podem ocorrer, geralmente em mandíbula ou maxila, porém, espessamentos corticais são os achados mais comuns. A hipertrofia congênita do epitélio pigmentado da retina é um achado comum, chegando a acometer 80% dos casos de FAP ao nascimento. Temos ainda o risco de outras lesões, tais como carcinoma de tireóide; hepatoblastoma; hiperplasia ou carcinoma de adrenal; tumores do sistema nervoso central (SNC); e cistos epidérmicos (GU et al. 2008; MIYAKI et al. 2008). Há ainda, variantes da FAP, tais como a síndrome de Gardner; a síndrome de Turcot; e a FAP atenuada (AFAP).

A síndrome de Gardner inclui a polipose colônica e duodeno-gástrica, tumores desmóides, além do desenvolvimento de tumores ósseos (osteomas) e de partes moles, anormalidades odontológicas, hipertrofia da retina, cistos epidérmicos, lipomas, e fibromas. Pelo envolvimento de diferentes órgãos, o tratamento pode tornar-se difícil. A proctocolectomia total com bolsa ileal é o tratamento de escolha para a polipose colônica, embora possa ocorrer o desenvolvimento de tumores desmóides, no sítio cirúrgico, com certa frequência (GALIATSATOS e FOULKES 2006; BISGAARD e BÜLOW 2006).

A síndrome de Turcot é caracterizada pelo desenvolvimento de tumores do SNC, além do fenótipo típico da FAP. O meduloblastoma é o tumor mais comumente associado, embora o astrocitoma e o ependimoma tenham sido descritos. Em 70% dos casos de síndrome

Turcot, mutações são detectadas no gene *APC*. Os outros 30% são causados por mutações nos genes de reparo, associados à síndrome de Lynch (SL) (FOULKES 1995).

A AFAP é uma forma menos agressiva da doença, com menos de 100 pólipos colorretais, e uma distribuição mais proximal. Os pólipos ocorrem em idade mais tardia, ao passo que o diagnóstico de CCR, em torno da sexta década. Em geral, a AFAP está associada a mutações nos éxons 3 e 4 do gene *APC*. Quanto menos agressiva é a polipose, mais difícil é o diagnóstico. Pacientes com menos de 100 pólipos adenomatosos podem ter AFAP, SL, ou outras poliposes menos comuns. Nestes casos, se houver manifestações extra-colônicas, estas podem auxiliar o diagnóstico diferencial. Nos casos onde não houver identificação de mutações no gene *APC*, e o fenótipo for semelhante ao da AFAP, deve-se fazer o diagnóstico diferencial com a síndrome recessiva de polipose intestinal ligada ao gene *MYH* (JASS 2008; MIYAKI 2008; KANTER-SMOLER et al. 2008; RIEGERT-JOHNSON et al. 2007; AVEZZÙ et al. 2008).

O diagnóstico precoce e o rastreamento são muito importantes na FAP. Os exames endoscópicos do cólon devem ser realizados na puberdade, idade de aparecimento das lesões. O trato gastrointestinal superior deve ser avaliado por endoscopia digestiva alta, quando do diagnóstico dos pólipos colônicos, ou pelo menos com 25 anos de

idade (DEBINSKI et al. 1995; PRESTON et al. 2008). A tireóide pode ser avaliada pelo exame físico, por meio da palpação, ou da ultrassonografia. O rastreamento de tumores desmóides pode ser realizado por meio de exames de imagem abdominais, principalmente naquelas famílias com antecedentes desse tipo de tumor (VASEN et al. 2008; GLEESON et al. 2008).

Síndrome de Lynch (SL)

Atualmente, o termo câncer colorretal hereditário sem polipose, ou HNPCC, tem sido menos utilizado para designar a clássica síndrome autossômica dominante de predisposição ao câncer (JASS 2006). Como a predisposição ocorre para tumores de diferentes sítios primários, e não somente para CCR, a denominação SL é menos restritiva. Tem sido utilizada para identificar famílias com pacientes portadores de CCR e tumores extracolônicos, desde que preencham critérios clínicos pré-estabelecidos (BOLAND 2005; VASEN e BOLAND 2005).

Os critérios diagnósticos para a SL são controversos, devido à variações fenotípicas (WANG et al. 2007). O diagnóstico clínico tem como base os antecedentes familiares de câncer, de acordo com os critérios de Amsterdam, e a suspeita clínica, de acordo com os critérios de Bethesda (VASEN 2005).

Em 1991, o Grupo Colaborativo Internacional em HNPCC (ICG/HNPCC) publicou os Critérios de Amsterdam (Quadro 1), com a intenção de promover uma padronização internacional no diagnóstico clínico da SL (VASEN et al. 1991)

Quadro 1 - Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico da SL.

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

Os critérios de Amsterdam tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico, porém, foram criticados por serem muito restritivos e não considerarem os tumores extracolônicos.

Era preciso melhorar a sensibilidade do rastreamento de pacientes suspeitos de SL. Por isso, foram propostas algumas recomendações, conhecidas como critérios de Bethesda (Quadro 2), mais sensíveis e menos restritivas que os critérios de Amsterdam. O objetivo não era fazer o diagnóstico clínico, mas sim identificar indivíduos candidatos aos testes genéticos de rastreamento, ou seja, pesquisar a instabilidade de microssatélites (MSI) (BOLAND et al. 1998).

Quadro 2 - Critérios de Bethesda para o rastreamento de indivíduos suspeitos de SL.

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

Em 1999, o grupo (ICG/HNPCC) modificou os critérios de Amsterdam publicados previamente, chamados agora de Amsterdam II, que passaram a incluir alguns tumores extracolônicos relacionados à SL, com o objetivo de torná-los menos restritivos para o diagnóstico clínico da síndrome (Quadro 3) (VASSEN et al. 1999).

Quadro 3 - Critérios de Amsterdam II para o diagnóstico clínico de SL.

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

Apesar das modificações nos critérios de Amsterdam, ainda havia dificuldade no diagnóstico clínico em famílias pequenas, com poucos descendentes, fato comum na Europa.

Em 2004, os critérios de Bethesda foram revisados, aumentado ainda mais sua sensibilidade em identificar indivíduos candidatos aos testes genéticos de rastreamento da SL (Quadro 4) (UMAR et al. 2004).

Quadro 4 - Critérios de Bethesda revisados, visando à identificação de indivíduos candidatos aos testes de rastreamento para a SL.

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

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

O surgimento de novos casos de câncer na família, ou de informações suplementares, pode levar a uma reclassificação dentro dos critérios estabelecidos, caracterizando, muitas vezes, uma síndrome típica. Em outras situações, a despeito da falta de critérios clínicos para a determinação de hereditariedade, a investigação molecular pode definir o diagnóstico de síndrome hereditária. Por essas razões, mesmo na ausência de caracterização clínica típica, critérios objetivos devem ser utilizados para direcionar a investigação de hereditariedade.

O constante progresso observado na caracterização clínica e molecular da SL leva a uma interpretação dinâmica dos fatos. Pode-se antever a possibilidade de reformulações nos critérios utilizados para o rastreamento e o diagnóstico. Nesse sentido, definir o espectro de tumores extracolônicos como algo imutável certamente levaria a erros de interpretação. A freqüente descoberta de novos achados moleculares tem sido de suma importância para definir de modo mais preciso a correlação genótipo-fenótipo, e, conseqüentemente, para o esclarecimento do correto espectro de tumores extracolônicos na SL (GYLLING et al. 2007).

Na década de 1980, diferentes sítios primários foram descritos em famílias com suposto diagnóstico de SL: endométrio, ovário, sistema nervoso central (SNC), trato hepato-biliar, intestino delgado,

trato urológico, mama (LYNCH et al. 1988, 1990), estômago (CRISTOFARO et al. 1987), pâncreas (LYNCH et al. 1985), e sistema linfático e hematopoiético (LOVE 1985). Diversas publicações sobre o assunto foram feitas, nas quais os cânceres mais comuns descritos como associados à SL eram: endométrio, estômago e trato urinário (MECKLIN et al. 1986; MECKLIN e JARVINEN 1986; FITZGIBBONS et al. 1987; PONZ DE LEON et al 1989; VASEN et al. 1990; MECKLIN, JARVINEN 1991; BENATTI et al. 1993).

A SL, assim como a FAP, é uma doença de herança autossômica dominante, com transmissão vertical, e sem preferência por sexo. A penetrância é da ordem de 80% (LYNCH e SMYRK 1996) e os pacientes não apresentam os múltiplos pólipos adenomatosos vistos na FAP, o que dificulta a identificação clínica dos portadores da doença. Assim sendo, o diagnóstico habitualmente é realizado já na presença de CCR.

Nos Estados Unidos, o risco cumulativo de um indivíduo desenvolver CCR durante a vida é de aproximadamente 6%. Mais de 15% dos casos podem ser atribuídos a predisposições herdadas ou familiares, entre elas a SL (HENDRIKS et al. 2006).

Quando comparamos CCR na SL com CCR esporádico, notamos predileção para: acometimento do cólon direito (68% vs.

49%); maior incidência de CCR sincrônico (7% vs. 1%); maior incidência de CCR metacrônico em 10 anos (29% vs. 5%); e manifestação mais precoce da doença, geralmente, entre 40 e 45 anos de idade (FITZGIBBONS et al. 1987). O aparecimento de tumores extracolônicos em outros membros da mesma família também pode indicar a presença da doença.

Alguns estudos demonstram que, na SL, a evolução do adenoma para o adenocarcinoma ocorre mais rapidamente em relação às lesões esporádicas (MENKO 1993; JASS et al. 1994; JÄRVINEN et al. 1995). Com um alelo mutado de forma germinativa, a inativação do alelo normal, que ocorre no tecido-alvo, geralmente por perda de heterozigose, sinaliza para o desenvolvimento da neoplasia (ROSSI et al. 2002a; VASEN 2005; BAUDHUIN et al. 2005). A razão adenoma-carcinoma nesses indivíduos é de praticamente 1:1, enquanto a estimativa equivalente para a população em geral é de 30:1. Isso ocorre em virtude de uma acelerada transição adenoma-carcinoma (JASS et al. 2002; FISHEL 2001). Acredita-se que a maioria dos pólipos adenomatosos, não tratados, sofre transformação maligna.

Os portadores de SL possuem risco aumentado de desenvolver CCR (60% a 70%, aos 70 anos), carcinoma endometrial (30% a 40%, aos 70 anos) e, com menores riscos, carcinomas de intestino delgado,

de células transicionais do trato urinário superior, câncer de ovário, câncer de estômago, tumores cerebrais (Síndrome de Turcot), e tumores de glândulas sebáceas (Síndrome de Muir-Torre) (HENDRIKS et al. 2006). O risco cumulativo de ocorrência de diferentes tumores relacionados à SL é apresentado em alguns estudos: 78% para CRC; 40% a 60% para endométrio; 19% para gástrico; 17,5% para trato biliar; 10% para trato urinário; e, 10% a 12% para ovário. O risco de qualquer tumor metacrônico pode chegar a 90% após o tratamento do CCR, e 75% após o tratamento de câncer de endométrio. O segundo tumor primário mais freqüente em um mesmo indivíduo é o CCR ou o câncer de endométrio (AARNIO et al. 1995; DUNLOP et al. 1997; AARNIO et al. 1999).

A era da genética molecular na SL teve início nos anos 1990, quando PELTOMÄKI et al. (1993) identificaram um *locus* no cromossomo 2p16, por meio de análise de ligação (*linkage analysis*), como sítio para um gene de predisposição para a SL. Depois de um ano, um segundo *locus* no cromossomo 3p21 foi identificado por LINDBLOM et al. (1993). Nessa época, demonstrou-se também que tumores de pacientes com SL apresentavam uma mudança molecular característica, chamada de fenótipo de erro de replicação (RER), hoje conhecida como MSI. O reconhecimento de que a MSI é consequência de defeito no sistema de reparo de erros de replicação do DNA levou à descoberta, nos *loci* 2p16 e 3p21, dos genes *MSH2* e *MLH1*,

considerados os principais responsáveis pela SL. Os dois genes respondem, aproximadamente, por 85% a 90% das mutações conhecidas, associadas à síndrome (PELTOMÄKI 2005; GOECKE et al. 2006).

Posteriormente, foram identificados os seguintes *loci*: 2q31-33, correspondente ao gene *PMS1*; 7p22, correspondente ao gene *PMS2*; e 2p16, correspondente ao gene *MSH6* (PALOMBO et al. 1995; DRUMMOND et al. 1995). Mutações em *MLH3* e *EXO1* ainda não têm sua relevância esclarecida (LAGERSTEDT et al. 2007).

Apesar de não haver consenso sobre a indicação primária para a investigação do gene *MSH6*, o número de famílias com mutações detectadas tem aumentado substancialmente (JIRICNY e NYSTRÖM-LAHTI 2000). A frequência de mutações em *MSH6* tem variado de acordo com a população estudada e o número de pacientes analisados, variando de 6% a 16% (DOVRAT et al. 2005).

Mutações no sistema de reparo causam freqüentes alterações nos tratos poliômico ou em seqüências repetitivas de bases, espalhadas pelo genoma, também conhecidas como microssatélites. Cerca de 90% dos indivíduos portadores de CCR e SL apresentam MSI no tecido tumoral (DE LA CHAPELLE 2005).

Dentre as regiões não-codificantes do genoma, cerca de 3% são compostas por seqüências repetitivas, randomicamente distribuídas. Estas seqüências são divididas em repetições dispersas ou satélites, sendo assim chamadas devido ao aparecimento, na espectrometria ótica, de uma banda “anexa”, ou “satélite”, junto à banda principal (BAUDHUIN et al. 2005; JENSEN et al. 2008). Os satélites são classificados de acordo com a extensão da seqüência repetitiva de DNA.

Os microssatélites pertencem a uma abundante classe de seqüências repetitivas intergênicas do genoma eucariótico e contêm repetições de motivos de 1 a 5 pares de bases, podendo chegar a ter até 200 pares de base de extensão total (ALBERTS et al. 1999). São chamadas de microssatélites mononucleotídeos as repetições de uma mesma base, de dinucleotídeos as repetições de duas bases, e assim por diante, até o agrupamento de seis bases. Em relação à freqüência, a repetição dinucleotídica CA é a mais comum, totalizando 0,5% do genoma. As repetições mononucleotídicas A e T representam 0,3% e as repetições dinucleotídicas GT ou AG representam 0,2% (FERNANDES 2007). Apesar de serem altamente polimórficos nas populações humanas, os microssatélites permanecem estáveis durante toda a vida de um indivíduo (SAKURAI et al. 2007).

Os microssatélites são, particularmente, propensos a deslizamentos das DNA polimerases, por desalinhamento da dupla fita, durante a replicação, resultando, freqüentemente, em desalinhamentos das fitas de DNA. Se não forem reparados, estes erros fixam-se como mutações, por meio de inserções ou deleções de uma ou mais repetições durante as replicações subseqüentes (IMAI e YAMAMOTO 2008).

A classificação de MSI é feita de acordo com a freqüência de alterações de marcadores selecionados, sendo considerados estáveis quando nenhum marcador apresenta-se alterado (MSS), com alta instabilidade quando mais de 30% dos marcadores estiverem alterados (MSI-H), e, finalmente, com baixa instabilidade quando menos de 30% dos marcadores estiverem alterados (MSI-L). Esta padronização é proposta pelo Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos, utilizando um painel de 5 marcadores: dois mononucleotídeos (BAT25 e BAT26) e três dinucleotídeos (D2S123, D5S346 e D17S250) (BOLAND et al. 1998).

A maioria das mutações nos genes de reparo resulta em expressão imunoistoquímica anormal de suas respectivas proteínas (BOLAND 2005; KIRK 2006). Portanto, outra ferramenta diagnóstica importante é a análise da expressão imunoistoquímica dessas proteínas. A pesquisa da expressão imunoistoquímica,

principalmente das proteínas MLH1 e MSH2, no tecido tumoral de pacientes com suspeita clínica de SL, tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento, da mesma forma que a pesquisa de MSI, na indicação do seqüenciamento. Deve-se, primeiramente, seqüenciar o gene correspondente à proteína não-expressa (MÜLLER et al. 2001; BAUDHUIN et al. 2005). LINDOR et al. (2002) encontraram 100% de sensibilidade da imunoistoquímica na detecção de MSI, com amostras de 1.144 pacientes considerados de alto risco para CCR. A falta das proteínas de reparo no tecido tumoral está altamente relacionada com a MSI (BAUDHUIN et al. 2005).

É importante ressaltar que a metilação de *MLH1* é um fenômeno epigenético, portanto, não-germinativo, que pode causar MSI, além de fenótipo característico, como tumores mucinosos em cólon direito, em pacientes jovens, mas sem antecedentes familiares. Por isso, a metilação de *MLH1* deve ser pesquisada quando mutações nos genes de reparo não forem encontradas.

A busca de mutações somáticas no oncogene *BRAF* também tem sido utilizada para identificar tumores esporádicos que exibem MSI. Aproximadamente 10% dos CCR esporádicos possuem mutações em *BRAF*, quase sempre a V600E. Há forte associação entre o tipo da mutação em *BRAF* e a MSI. Além disso, freqüentemente as mutações

em *BRAF* estão associadas à metilação do promotor de *MLH1*, e, raramente, à SL. (LAGERSTEDT et al. 2007; ZHANG 2008).

Como as proteínas de reparo do DNA formam heterodímeros, padrões de imunoistoquímica distintos são esperados. O reconhecimento de erros de bases simples, e de *loops* de inserção e deleção (IDLs), é realizado pelo heterodímero MSH2 e MSH6 (MutS α), enquanto que o heterodímero MSH2 e MLH3 reconhece os IDLs na falta de MSH6. O heterodímero MLH1 e PMS2 (MutL α) medeia a interação do reconhecimento do erro e de seu reparo (HALVARSSON et al. 2006). Na falta de PMS2, a proteína MLH3 é a candidata para formar o heterodímero com MLH1.

Os anticorpos utilizados na imunoistoquímica apresentam como padrão a coloração nuclear. Células tumorais que apresentam coloração citoplasmática, ausência ou redução dessa coloração, na presença de células não-neoplásicas com coloração nuclear, são consideradas como tendo um padrão anormal.

A análise de MSI e o estudo da expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo são muito importantes como métodos de rastreamento de indivíduos e famílias com suspeita clínica de SL. Quando a MSI está presente, há indicação de seqüenciamento dos principais genes de reparo, que deve ser iniciado pelo gene correspondente à proteína não-expressa. Essas informações são

fundamentais no manejo desses pacientes e de suas famílias (LYNCH et al. 2007).

Quando se identifica a mutação germinativa em uma família, deve-se oferecer o teste genético de predisposição ao câncer aos indivíduos sob risco, condição básica para o diagnóstico definitivo de portadores assintomáticos (ENG et al. 2000).

De acordo com DE JONG et al. (2004), participam da SL os genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2* e *PMS1*. Em 2004, a *International Society of Hereditary Gastrointestinal Cancer* (www.insight-group.org) publicou seu banco de dados, com 448 mutações patogênicas causadoras de SL, sendo 50% em *MLH1*, 39% em *MSH2*, e 7% em *MSH6*. Mais recentemente, uma publicação canadense, com base em mutações publicadas na literatura (www.med.mun.ca/MMRvariants), mostra 39% das mutações em *MLH1*, 40% em *MSH2*, 16% em *MSH6*, e 6% em *PMS2* (NILBERT et al. 2008).

Mutações patológicas têm sido descritas em 88% das famílias que preenchem os critérios de Amsterdam, e em 80% dos pacientes que apresentam MSI (LYNCH et al. 2007).

Famílias que preenchem critérios clínicos para SL, mas que não apresentam mutação nos genes de reparo, continuam sob risco,

mas sem o diagnóstico definitivo de SL. Estas famílias representam um importante subgrupo para estudos moleculares, sendo necessário descartar o diagnóstico molecular de outras síndromes de predisposição ao CCR, como, por exemplo, Li-Fraumeni ou polipose familiar atenuada. Caso não se identifique uma síndrome conhecida, essas famílias têm sido classificadas, mais recentemente, como “Câncer Colorretal Familiar do Tipo X” (BOLAND 2005; CASE et al. 2008).

A SL é a síndrome hereditária mais comum na espécie humana, com incidência entre 1:2.000 e 1:660 indivíduos (DE LA CHAPELLE 2005). É fundamental que os pacientes sob risco, assim como suas famílias, realizem programas de rastreamento e protocolos de manejo. Importante ressaltar que não foram encontrados dados sobre a incidência de SL no Brasil, pois a grande maioria dos estudos é de origem européia ou americana, realizada em populações caucasianas. Os achados podem ser diferentes em países subdesenvolvidos e em populações que não as caucasianas (DE LA CHAPELLE 2005).

O tratamento e o seguimento de pacientes portadores de CCR e SL são diferentes em relação aos pacientes com CCR esporádico (VASEN 2005; MÜLLER et al. 2001). Para pacientes com câncer de cólon e SL, deve ser considerada, por exemplo, na escolha da conduta

terapêutica, a colectomia total, com reconstrução por meio de anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Em casos de tumores retais, a proctocolectomia deve ser considerada. Tal conduta pode ser indicada em razão da alta probabilidade de o indivíduo desenvolver novo tumor no cólon, no decorrer de sua vida. Por isso, é importante identificar, entre os pacientes com CCR, aqueles portadores de SL. Nos casos de câncer extracolônico, as cirurgias devem seguir o padrão oncológico clássico para o órgão afetado. Os familiares sob risco, portadores assintomáticos da predisposição genética, também devem ser identificados, pois podem beneficiar-se de um seguimento intensivo, com o objetivo de diagnóstico de lesões precoces.

Além disso, toda a família deve passar por um aconselhamento de risco, que esclareça detalhes sobre a doença, os benefícios e as limitações dos exames de seguimento, assim como dos testes de predisposição (LYNCH 2007).

A indicação de tratamento na SL é mais complexa que na FAP, pois não são encontradas as centenas de pólipos adenomatosos benignos que se desenvolvem durante anos antes da transformação maligna, o que permite um melhor planejamento cirúrgico. O aparecimento de CCR em pacientes portadores de SL pode advir de pólipos adenomatosos isolados ou de carcinomas *de novo*, isto é, sem

a presença de pólipos que anteceda à transformação para carcinoma (ROSSI e PINHO 1999).

Na orientação de membros assintomáticos de famílias de SL são considerados três grupos: 1) aqueles sabidamente portadores da predisposição genética; 2) aqueles sabidamente não-portadores da predisposição genética; e 3) aqueles sem informações com relação ao teste.

No grupo de indivíduos sabidamente portadores da predisposição genética e sem diagnóstico de CCR, há controvérsia sobre a realização ou não de uma colectomia total profilática, com anastomose ileorretal. Conforme foi visto, a penetrância do gene é próxima de 80%, e, portanto, 20% dos pacientes seriam operados desnecessariamente. Além disso, há questões referentes à morbimortalidade do tratamento cirúrgico e à chance de aparecimento de tumores em outros órgãos-alvo, ou no reto remanescente. O risco de câncer de reto, após colectomia total, pode chegar a 12%, em 12 anos de seguimento (RODRIGUEZ-BIGAS et al. 1997). Não há propósito em realizar ressecções múltiplas profiláticas em órgãos-alvo considerando apenas o “provável” fenótipo da doença (SORAVIA et al. 1997). Entretanto, a controvérsia sobre a indicação de cirurgias profiláticas permanece, com uma tendência a não realizá-las como procedimentos-padrão. Elas devem ser oferecidas

como possibilidade terapêutica ao paciente, a partir da clara exposição dos prós e contras, para uma decisão consciente e conjunta (CHURCH et al. 1996). A conduta mais aceita é o seguimento rigoroso com colonoscopias realizadas com intervalos de um ano, a partir de 25 anos de idade. A histerectomia profilática, com ooforectomia, é uma opção para mulheres com prole constituída e para portadoras assintomáticas da alteração genética, de acordo com recente evidência de eficácia (CASE et al. 2008). É importante lembrar que, para realizar o teste genético de predisposição em indivíduos de uma família portadora de SL, é necessário que a mutação tenha sido detectada em um membro da família que tenha desenvolvido CCR (probando).

Endoscopia digestiva alta, exames de urina tipo I e citologia urinária, dosagem de CA125 e ultrassonografia abdominal devem ser considerados no rastreamento de lesões extracolônicas. Nas mulheres, deve ser considerada, também, a ultrassonografia transvaginal para estudo do endométrio (LYNCH e SMYRK 1996; ROSSI et al. 1998).

Nos indivíduos sabidamente não-portadores de predisposição herdada, não há controvérsia, pois, nesse grupo, o risco de desenvolver CCR é igual ao da população em geral. Assim sendo, seu

seguimento deve ser feito somente em casos com sintomas clínicos específicos.

Estabelecer uma rotina de atendimento de pacientes portadores de CCR com predisposição hereditária, juntamente com suas famílias, é fundamental. Esse atendimento deve ser realizado por uma equipe multidisciplinar, com as informações organizadas em um registro de famílias (banco de dados), e deve incluir aconselhamento de risco, com indicação de testes genéticos de predisposição, rastreamento, tratamento e seguimento (ROSSI et al. 1997).

Contribuição para o estudo do câncer colorretal com predisposição hereditária no Brasil

Quando do término de minha residência médica em cirurgia oncológica, em janeiro de 1988, a informática ainda não fazia parte do dia-a-dia dos profissionais da Área da saúde. Uma das maiores dificuldades em avaliar os resultados de um determinado tratamento referia-se a localizar pacientes específicos e resgatar as informações de seus prontuários para análise. Assim, no final de 1989, montamos um banco de dados informatizado, do qual constavam os pacientes atendidos no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital A.C. Camargo. Esse banco de dados entrou em uso no início de 1990. O uso dessa ferramenta apontou para um grande número de pacientes jovens, portadores de câncer colorretal (CCR), além de famílias com vários casos de câncer. Pudemos constatar também que membros de famílias portadoras de polipose adenomatosa eram atendidos de maneira isolada e sem padronização de rastreamento, tratamento ou seguimento.

Por isso, durante 1991, foi estruturado outro banco de dados, não-informatizado, colocado em uso no início de 1992. Era o começo do Registro de Câncer Colorretal Hereditário (RCCH) do Hospital A.C. Camargo, cujo símbolo está representado na Figura 1.

Figura 1 – Símbolo do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, criado em 1992.

Por definição, a principal finalidade de um registro é arquivar dados. Um registro familiar de câncer tem três funções básicas na utilização dos dados armazenados: clínica, educacional e de pesquisa (DEAN et al. 2000; CHURCH e MCGANNON 2000; CHURCH et al. 2004).

Dentro da função clínica, destacam-se:

- ✓ Identificar indivíduos sob risco para desenvolver câncer, de acordo com a predisposição familiar específica;
- ✓ Realizar aconselhamento de risco para os indivíduos e suas famílias;
- ✓ Indicação de testes de predisposição ao câncer, incluindo aconselhamento pré e pós-teste;
- ✓ Orientar quanto aos exames de rastreamento e seguimento para indivíduos sob risco;
- ✓ Manter e atualizar os dados das famílias registradas.

Na função educacional, o registro deve dividir seus esforços, disseminando informações entre pacientes e familiares, e também entre profissionais de saúde, principalmente com foco na formação e no desenvolvimento de competências em genética do câncer, tais como: obter história familiar; construir heredogramas; reconhecer os tipos de herança; avaliar os riscos; indicar testes de predisposição; realizar aconselhamento pré e pós-teste; esclarecer todas as limitações que os testes de predisposição possam apresentar.

Na área da pesquisa, a função maior de um registro é fornecer subsídios, por meio de dados confiáveis e atualizados, para que sejam desenvolvidos estudos com vistas a uma maior compreensão dos fenômenos hereditários no desenvolvimento do câncer.

O RCCH foi criado com a principal missão de contribuir para a diminuição da morbidade e mortalidade do câncer, por meio da educação de indivíduos e de suas famílias sobre os riscos e as implicações da predisposição hereditária ao câncer. Deve também coordenar ações de rastreamento, tratamento e seguimento de indivíduos sob risco, além de gerar subsídios para pesquisas na Área.

Atualmente, o RCCH tem mais de trezentas famílias cadastradas, divididas conforme os antecedentes familiares de câncer, como podemos ver na Tabela 1, a seguir.

Tabela 1 - Pacientes cadastrados no registro CCRH, até maio de 2008, de acordo com os antecedentes familiares de câncer.

Categoria	N	%
Síndrome de Lynch	64	21
Critérios Bethesda	125	41
CCF	40	13
AFC	30	10
FAP	17	6
AFAP	5	2
Outras Poliposes	4	1
Mama-cólon	10	3
Outras hereditárias	10	3
Total	305	100

Síndrome de Lynch - de acordo com os critérios de Amsterdam;

Critérios de Bethesda - suspeita de CCR hereditário, de acordo com os critérios de Bethesda;

CCF - câncer colorretal familiar- de acordo com os critérios de Amsterdam, exceto por um não preenchido;

AFC - agregação familiar de câncer - outras agregações familiares de câncer, não-características;

FAP - polipose adenomatosa familiar;

AFAP - polipose adenomatosa familiar atenuada.

Na fase inicial do RCCH, as primeiras famílias cadastradas apresentavam polipose adenomatosa (FAP), síndrome hereditária conhecida e bem estabelecida. Apesar de realizado de forma manual, o registro das fichas individuais e familiares propiciou a construção dos heredogramas, facilitando a visualização de toda a estrutura familiar. Com isso, cumpriu-se o objetivo de estabelecer critérios de rastreamento, tratamento e seguimento de cada membro sob risco. Tais indivíduos foram orientados a vir ao hospital para receber orientações e realizar exames de rastreamento. Vários deles tiveram o diagnóstico feito e foram submetidos às primeiras proctocolectomias totais com reconstrução com bolsa ileal e anastomose anal, realizadas no Hospital A.C. Camargo.

Paralelamente, ocorria um grande avanço no campo da biologia molecular, incluindo a identificação, em 1991, do gene *APC*, causador da FAP. Em 1994, foi identificada a mutação causadora da FAP em uma família do RCCH. O estudo foi realizado em conjunto com o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, pelo pesquisador Arnaldo Medeiros. Esta foi a primeira mutação identificada no gene *APC* em uma família brasileira portadora de FAP, publicada em 1997, em literatura nacional, e novamente em 1998, com uma revisão sobre CCR hereditário, contendo propostas de atendimento (ROSSI et al. 1997, 1998) (Anexos 1 e 2).

No RCCH, usamos uma padronização de símbolos nos heredogramas de famílias com CCR hereditário, como demonstrado na Figura 2.

Figura 2 - Padronização de símbolos usados nos heredogramas de famílias com CCR hereditário.

Nas Figuras 3, 4 e 5, abaixo, apresentamos os heredogramas de três famílias de FAP do RCCH, com as respectivas características clínicas e mutações identificadas no gene *APC*.

Figura 3A – Heredograma - família M.

Seqüência normal

AAT CAG ACG ACA CAG GAA GCA GAT TCT GCT AAT

Seqüência mutada

AAT CTA GAC GAC ACA GGA AGC AGA TTC TGC **TAA** Stop

Legenda: Gene *APC*, exón 15, códon 1.291, inserção de “T” causando uma mutação *frameshift* alguns códons adiante na seqüência.

Fenótipo: polipose profusa, de comportamento agressivo, início dos pólipos na adolescência, desde o estômago/duodeno/colorretal. Malignização dos adenomas aos 20 anos de idade.

Figura 3B – Mutação identificada - família M.

Legenda: Fenótipo: polipose esparsa, restrita ao cólon, poupando o reto, com início dos pólipos aos 25 anos, diagnóstico de câncer aos 40 anos.

Mutação identificada: gene *APC*, exón 13, códon 564, tipo *nonssense*

CGA (Arg) > TGA (*stop*)

Figura 4 – Heredograma - família D.

Legenda: Fenótipo: ausência de antecedentes familiares, pais e irmãos investigados. Mutação *de novo*, com comportamento agressivo, polipose profusa, adenomas desde a infância em estômago/duodeno/colorretal.

Mutação identificada: gene *APC*, tipo *frameshift*, exón 15, com deleção de cinco bases (AAAGA) a partir do códon 1.309, com *stop* logo a seguir, no códon 1.312.

Figura 5 – Heredograma – família T.

Como a principal causa de morte na FAP é o CCR, a retirada cirúrgica do cólon é parte fundamental do tratamento. Geralmente, este procedimento é feito em adultos jovens, antes da malignização dos adenomas, pois o risco de câncer aumenta com o tempo. Entretanto, não há uma idade ideal pré-estabelecida para a cirurgia. Esta consiste na colectomia total com anastomose ileorretal, ou proctocolectomia total com bolsa ileal e anastomose da bolsa ao ânus. A colectomia total com preservação do reto, embora traga melhores resultados funcionais para o paciente, carrega um alto risco de aparecimento de tumor no reto remanescente, por isso deve ser feito um acompanhamento por meio de exame endoscópico (ROSSI et

al. 2005).

A proctocolectomia total, com reconstrução por meio de bolsa ileal, implica a retirada de quase toda a mucosa colônica, o que diminui consideravelmente o risco de câncer. Contudo, observa-se a formação de pólipos na bolsa ileal com o decorrer do tempo pós-operatório. Acredita-se que isto ocorra por causa de dois motivos principais: alteração germinativa do gene *APC*, e um processo de “colonização” da mucosa ileal. Alguns autores citam modificações metaplásicas do íleo (atrofia das vilosidades, hiperplasia de criptas) como razão para desenvolver adenomas, e, eventualmente, de carcinomas na bolsa ileal. Outros acreditam que mudanças adaptativas ocorreriam na bolsa ileal, de modo que ela funcione como um “neorreto”. Outra hipótese é que essas alterações possam resultar da mudança do conteúdo luminal na bolsa ileal, que atuaria como carcinógeno (LUEBECK e MOOLGAVKAR 2002; THOMPSON-FAWCETT et al. 2001a). De qualquer modo, a história natural do desenvolvimento de pólipos na bolsa ileal de pacientes com FAP é desconhecida.

WU et al. (1998) apresentaram um estudo prospectivo para determinar a incidência de pólipos em bolsa ileal e íleo distal após proctocolectomia. Seguiram 26 pacientes, por um período médio de 66 meses (11 a 156 meses,) e identificaram uma incidência de pólipos de 42%. Foi observado também que a incidência aumentou com o

tempo decorrido da cirurgia e que não houve relação entre o número de pólipos e a severidade da doença em cólon ou em duodeno (WU et al. 1998). NUGENT et al. (1993) observaram 38 pacientes, em média por 4,7 anos após colectomia, com exames endoscópicos anuais, e encontraram uma incidência de 21% de pólipos em bolsa ileal. IIDA et al. (1999) encontraram uma incidência de 50% depois de seguimento médio de 80 meses, mas TONELLI et al. (1997), observando 24 pacientes por 5 anos, obtiveram apenas 4% de incidência. Mais recentemente, GROVES et al. (2005) observaram uma incidência de 57% e uma significativa associação entre a presença de adenomas na bolsa com o maior tempo decorrido da cirurgia. Não houve, neste estudo, correlação, entre a severidade da polipose em cólon ou duodeno, com a presença de pólipos.

Há uma variação importante (4% a 57%) na incidência de pólipos em bolsa ileal, sendo que números menores são encontrados em estudos com menor tempo de seguimento (5 anos), em comparação com aqueles de seguimento maior (7 anos). PARC et al. (2001), em estudo retrospectivo, analisaram 85 pacientes portadores de bolsas ileais, encontrando forte associação da incidência de pólipos e o tempo de existência da bolsa, tendo em 5, 10 e 15 anos, respectivamente, uma incidência de 7%, 35% e 75%. Um dado a mais deste estudo foi que não houve relação entre o desenvolvimento de adenomas e a caracterização da mutação no gene *APC*.

Em estudo retrospectivo recente, houve uma alta incidência de adenomas de baixo grau, o que, mais uma vez, levou a questionar sobre o comportamento de tais lesões (MOUSSATA et al. 2008).

Embora vários estudos demonstrem claramente a formação de pólipos em bolsa ileal, não há estudos avaliando as causas deste fenômeno. Todos os estudos citados acima não diagnosticaram casos de câncer oriundos dos pólipos em bolsa ileal. Não há definição da seqüência adenoma-carcinoma em mucosa de bolsa ileal.

Sabe-se que o adenocarcinoma da bolsa ileal pode surgir em pacientes sem FAP, mas que realizam o mesmo procedimento cirúrgico utilizados para a FAP, como, por exemplo, pacientes portadores de retocolite ulcerativa (UC). Há pelo menos 13 casos relatados na literatura de adenocarcinoma em bolsa ileal em pacientes com retocolite ulcerativa. Isso tem se tornado mais freqüente, podendo estar relacionado com o tempo de seguimento. A mucosa sofre uma adaptação caracterizada por atrofia das vilosidades, seguida de severa inflamação e displasia, como se fosse uma "recorrência" da retocolite ulcerativa em bolsa ileal (WALKER e RADLEY 2006). Este processo inflamatório severo é encontrado mais comumente em pacientes operados por UC que por FAP (MOSKOWITZ et al. 1986).

Outro estudo, que busca estabelecer o risco de displasia em pacientes com UC, analisou 106 pacientes, dos quais 42 tinham

bolsa ileal por mais de 12 anos. Concluiu-se que a displasia é um evento raro, mesmo quando o período de existência da bolsa é longo (THOMPSON-FAWCETT et al. 2001b). A imunoistoquímica de p53, em bolsa ileal, não se mostrou alterada em estudo de COULL et al. (2007).

Sabe-se que mutações no gene *APC* podem levar a um estado proliferativo. FRIEDERICH et al. (2007) realizaram um estudo avaliando a expressão imunoistoquímica de MIB-1 em mucosa de bolsa ileal e mucosa de alça aferente de íleo de pacientes com FAP. A bolsa ileal apresentou um alto índice de proliferação em relação ao íleo. Este é um dos poucos estudos que compara mucosa de íleo e bolsa ileal em pacientes com FAP.

Em recente estudo, sobre as mudanças ocorridas em criptas colônicas, durante a formação de adenomas, em pacientes com FAP, foi observado que a mutação do gene *APC* causa expansão da população da cripta basal, incluindo células-tronco das criptas. Esse aumento das células-tronco pode explicar o padrão proliferativo e a tumorigênese precoce do cólon. Ainda nesse estudo, a imunoistoquímica para p53 mostrou-se positiva em dois terços das amostras em células da base da cripta colônica, principalmente em adenomas (3/4 dos casos). Tendo em vista que a mutação causadora da FAP é germinativa, a formação de adenomas em bolsa ileal poderia

estar relacionada a um estado proliferativo nas criptas das células do íleo (BOMAN et al. 2004).

Um estudo experimental em camundongos com mutação no gene *APC* demonstrou uma redução importante na expressão de algumas proteínas kinases C (PKC's) em adenomas, quando comparada à mucosa ileal normal. Visto que a principal expressão fenotípica da mutação do *APC* refere-se ao surgimento de adenomas, as alterações na expressão das PKC's, entre outras proteínas, podem refletir a função do gene *APC*, demonstrando seu envolvimento na carcinogênese. A PKC alfa apresenta seus níveis reduzidos no adenoma em relação à mucosa normal (KLEIN et al. 2000). Em outro estudo com camundongos *knockouts* para PKC alfa, houve o desenvolvimento de tumores mais agressivos quando o *APC* estava mutado, além de uma elevada tendência para a formação de tumores intestinais espontâneos, mesmo nos camundongos sem mutação do *APC* (KAHL-RAINER et al. 1994). A PKC delta funciona como supressor de tumor em estudos experimentais com camundongos, e sua superexpressão atenua o fenótipo transformado de células epiteliais colônicas *in vitro*, porém, sua função é mediada por p53, que, se inativo, torna a PKC delta inativa também (PERLETTI et al. 2004). A PKC epsilon, em estudos com camundongos, tem atividade oncogênica. Sua superexpressão causa transformação maligna em células epiteliais colônicas, pela interação com a via de sinalização

ras (PERLETTI et al. 1998). A PKC ι também tem atividade oncogênica e sua elevada expressão em tumores colônicos sugere uma participação importante na carcinogênese do cólon (MURRAY et al. 2004).

A proteína quinase C, família de 11-serina-treonina quinases, participa de uma variedade de processos celulares incluindo mitogênese, diferenciação e apoptose. Os membros dessa família parecem realizar um importante papel na carcinogênese colorretal. A alteração da expressão das PKC's já foi associada à progressão de carcinomas ovarianos e também a um papel influenciador nas vias de regulação da homeostase celular (CORNFORD et al. 1999; CORFIELD et al. 2001; WEICHERT et al. 2003).

As mucinas são glicoproteínas de alto peso molecular. A superfície epitelial, incluindo o epitélio colônico, é revestida e protegida por muco. Se no cólon normal as mucinas têm uma função protetora, em CCR as alterações nas mucinas são freqüentemente encontradas. As mucinas dividem-se em duas classes, estrutural e funcionalmente distintas: as secretadas na forma de gel (MUC2, MUC5AC e MUC6) e as mucinas transmembrana (MUC1). A maioria dos órgãos parece sintetizar mais do que um tipo de mucina, porém, um tipo particular parece predominar em cada órgão. Uma característica comum dos tumores gastrointestinais é a perda de

especificidade órgão-mucina. Por exemplo, temos a MUC5AC expressa normalmente no tecido gástrico e expressa de forma aberrante em adenomas colorretais (BYRD e BRESALIER 2004).

A MUC1 é normalmente detectada na superfície da mucosa do epitélio do antro, piloro e corpo do estômago. A expressão de MUC1 está aumentada em tumores de cólon em relação à mucosa normal. Em comparação aos outros epitélios, a MUC1 do cólon é mais intensamente glicosilada, não permitindo a marcação pelo anticorpo específico para a MUC1. Em adenocarcinomas colorretais, e também em pólipos adenomatosos, a MUC1 é menos glicosilada, permitindo sua imunodeteção. A MUC1 parece funcionar como um marcador negativo de mucosa colônica normal (BYRD e BRESALIER 2004). A MUC1 está duas vezes mais expressa em CCR com metástases hepáticas do que nos casos sem essa disseminação, sendo sua expressão imunoistoquímica um marcador de mau prognóstico (NAKAMORI et al. 1994).

A MUC2 tem sua expressão diminuída em adenocarcinomas colorretais, mas está preservada em carcinomas mucinosos. Experimentos em animais sugerem que a diminuição da MUC2 poderia contribuir para a carcinogênese colônica, pois sua inativação causa, em camundongos, o aparecimento de tumores, primeiramente no intestino delgado, e mais tarde, no cólon. Essas alterações são

acompanhadas por aumento da proliferação, diminuição da apoptose e aumento da migração de células epiteliais do intestino. Não se sabe se essas alterações ocorrem, primariamente, em decorrência da ausência de MUC2, ou se devido à resposta secundária à proteção ou à lubrificação inadequada do epitélio intestinal (VELCICH et al. 2002). Os carcinomas mucinosos de mama usualmente causam menos metástases linfonodais e têm melhor prognóstico, quando comparados aos carcinomas ductais invasivos. Pela imunoistoquímica, o carcinoma mucinoso expressa MUC2 e o carcinoma ductal invasivo não tem expressão de MUC2. Isto sugere que a expressão de MUC2 está associada com características biológicas de menor agressividade (MATSUKITA et al. 2003). Há expressão de MUC2 em carcinomas mucinosos de outros órgãos, como pâncreas e ovário (TASHIRO et al. 1994; NAKAMURA et al. 2002). A MUC2 sofre influência também dos ácidos biliares. Células tumorais do cólon, quando expostas aos ácidos biliares, aumentam a expressão de MUC2, por aumento de transcrição (SONG et al. 2005).

A MUC5AC é um produto normal da mucosa gástrica, expressa na superfície das células da mucosa da região da cárdia, fundo e antro. As células traqueobrônquicas também a expressam normalmente, porém, a MUC5AC não está presente no cólon normal. Sabe-se que em adenomas e tumores colorretais ela está freqüentemente expressa. Em virtude desta característica, sugere-se

que a MUC5AC poderia ser usada como preditor de recorrência de adenomas. A imunorreatividade da MUC5AC é maior em pólipos de moderado grau histológico e moderada displasia, sofrendo um decréscimo em pólipos de alto grau e severa displasia (BUISINE et al. 1996). Outro estudo também demonstra que pacientes com tumores negativos para MUC5AC têm pior prognóstico do que pacientes com tumores positivos, sugerindo que a ausência de MUC5AC nos tumores é fator de maior agressividade (KOCER et al. 2002). Em 94 casos de tumores gástricos, demonstrou-se que a detecção de mucinas está associada ao tipo de tumor. A MUC5AC foi associada aos carcinomas difusos e infiltrativos, enquanto a MUC2 foi associada aos carcinomas mucinosos. Em tumores de mama, tanto carcinomas mucinosos como carcinomas ductais, há pouca expressão de MUC5AC (PINTO-DE-SOUSA et al. 2002; MATSUKITA et al. 2003).

A MUC6 tem pouca ou nenhuma expressão no cólon normal. Em um estudo de BARTMAN et al. (1999), foi detectada a presença desta mucina em adenomas por imunoistoquímica.

O *bcl2* é um gene anti-apoptótico expresso nas criptas do cólon humano. No intestino delgado, as células basais das criptas têm uma tendência de hiperproliferação, por isso, nessa região, ocorre de 5% a 10% de apoptose espontânea. No cólon, a taxa de apoptose espontânea é baixa. Contudo, em estudo experimental com

camundongos *knockout* para *bcl2*, houve aumento na taxa de apoptose espontânea de células basais das criptas colônicas. Logo, este estudo sugere que a proteína *bcl2* pode regular uma aparente resistência das células-tronco colônicas à apoptose (POTTEN 1992; MERRITT et al. 1995). No intestino delgado, a expressão de *bcl2* não é vista. Nos adenomas humanos, a expressão de *bcl2* está aumentada, enquanto baixos níveis são geralmente encontrados em carcinomas. Um estudo recente demonstrou que a expressão de *bcl2* está significativamente elevada nos adenomas e relacionada à displasia (TZOUVALA et al. 2008).

A CDX2 é uma proteína especificamente expressa no intestino, e é importante para a regulação do desenvolvimento e manutenção da célula epitelial intestinal. Em camundongos, a expressão de CDX2 no embrião age, especificamente, na diferenciação das vilosidades do intestino delgado distal e cólon proximal, e sua mutação leva a desenvolver tumores colônicos (CHAWENGSAKSOPHAK et al. 1997; SILBERG et al. 2000)

Não foram encontrados estudos avaliando o perfil imunoistoquímico das mucosas colônica, ileal e de bolsa ileal, em pacientes portadores de FAP. Por esse motivo, enviamos à FAPESP, um projeto de pesquisa visando avaliar os seguintes marcadores: PKC's α (alfa), λ (lambda), δ (delta), ϵ (épsilon), ι (iota), beta-catenina, K-

ras, CDX2, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC 1, MUC 2, MUC 5AC E MUC 6. O projeto foi aprovado em 2006, para estudar pacientes portadores de FAP, submetidos à proctocolectomia total, com reconstrução intestinal por bolsa ileal e seguimento mínimo pós-operatório de oito anos.

Foi revisto o banco de dados do RCCH, e 20 pacientes foram inicialmente selecionados, sendo que 17 foram incluídos no estudo, porém, somente 16 tiveram suas amostras estudadas. As biópsias de mucosa de bolsa ileal (4-5 amostras) foram obtidas por endoscopia endoanal em mucosa aparentemente normal. Apenas 7 pacientes, entre os 16, tinham as amostras de íleo e de cólon disponíveis, da peça cirúrgica inicial armazenada, possibilitando a avaliação comparativa. As lâminas foram vistas por uma única patologista, Dra. Renata Coudry.

A avaliação foi qualitativa, considerando-se positivas as células que continham a coloração acastanhada, de acordo com o local de expressão de cada marcador (citoplasma/membrana/núcleo). A variação de intensidade das reações foi avaliada, utilizando as graduações a seguir:

p53:

- negativo
- $\frac{1}{2}+$ criptas parcialmente coradas
núcleo com positividade fraca
- + criptas totalmente coradas
núcleo com positividade fraca
- ++ criptas totalmente coradas
núcleo com positividade moderada
- +++ criptas totalmente coradas
núcleo com positividade forte

Demais marcadores:

- negativo
- + positividade fraca
- ++ positividade moderada
- +++ positividade forte

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital A.C.Camargo, e financiado pela FAPESP sob o número 2006/04024-8.

Podemos ver as principais características dos pacientes nas Tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Características clínicas dos pacientes.

CASOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17
Idade (anos)	47	36	26	50	36	25	24	42	46	32	39	53	53	55	43	44
Sexo	F	M	M	F	F	F	F	F	M	M	F	M	F	M	M	M
Lesões extra-colônicas	N	S	S	N	S	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N	N

F - feminino; M - masculino; N - não; S - sim; AINH - anti-inflamatório não-hormonal.

Tabela 3 – Características da evolução pós-operatória dos pacientes.

CASOS	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	14	15	16	17
Tempo de cirurgia (anos)	14	12,5	8	11	8,5	8	8	11	12	9,5	9	10,5	9	13	11	13
Pólipos pós-cirurgia	N	S	N	N	S	S	N	N	S	S	N	N	N	S	N	S
nº de evacuações/dia	4	3	4	3	3	*	5	4	**	5	3	2	3	3	3	4

F - feminino; M - masculino; N - não; S - sim; AINH - anti-inflamatório não-hormonal; * - paciente com sub-oclusão devido à tumor desmóide; ** - constipado.

Onze, entre os 16 pacientes, apresentaram algum grau de atrofia em suas vilosidades da bolsa ileal. No estudo comparativo com o íleo da peça cirúrgica inicial, as 7 amostras ileais continham as vilosidades preservadas, enquanto 4/7 amostras das bolsas ileais continham algum grau de atrofia (Figuras 6 e 7). Nas amostras da bolsa ileal, apesar de colhidas em áreas de tecido macroscopicamente normais, em 3 casos, houve presença de micro-adenomas. Interessante é que dois pacientes não apresentaram pólipos macroscopicamente identificados no seguimento após a cirurgia. Se levarmos em conta estes dois casos, nossa incidência de pólipos após cirurgia sobe para 56,25%.

Figura 6 - Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento parcial das vilosidades, aumento de 10x.

Figura 7 - Corte de tecido de bolsa ileal corado com hematoxilina-eosina com achatamento total das vilosidades, aumento de 10x.

As mucinas apresentaram padrão de expressão característico para o intestino, com positividade apenas para a MUC2 (Tabela 4). Observamos que as biópsias de bolsa ileal tiveram uma maior intensidade de expressão para MUC2 em relação ao íleo e ao cólon, fato atribuído à melhor qualidade da amostra. O íleo e o cólon da peça cirúrgica mostraram expressão semelhante. Não houve diferença de intensidade entre os pacientes. A expressão de MUC5AC foi positiva na porção superficial do epitélio de aparência normal, em área adjacente a um micro-adenoma, em uma das amostras de bolsa ileal. Ao contrário, MUC1 e MUC6 não apresentaram expressão em superfície de micro-adenoma (Figura 8).

Tabela 4 – Expressão das mucinas comparativamente no íleo, cólon e bolsa ileal.

Casos		2			3			7			8			11			14			15		
Amostras		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
Marcadores	MUC1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MUC2	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++	+	+	++
	MUC5AC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MUC6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

I - íleo; C - cólon; BI - bolsa ileal; MUC - mucina.

Legenda: Aumento de 40x, A e B corados com MUC1; C e D corados com MUC5AC; E e F corados com MUC6. As imagens A, C e E representam epitélio normal; B, D e F representam área de micro-adenoma. Observa-se em D expressão de MUC5AC em epitélio superficial, em área adjacente ao micro-adenoma. Não houve expressão nas demais amostras.

Figura 8 – Estudo imunoistoquímico de tecido de bolsa ileal.

A proteína bcl2 teve expressão de fraca intensidade, uniforme no citoplasma das células, em todas as amostras, seja no íleo, no cólon ou na bolsa ileal. O citoplasma da porção basal das criptas apresentava-se com positividade maior que a vilosidade.

A beta-catenina apresentou expressão de membrana preservada, mas também uma discreta positividade em citoplasma, com predomínio nos adenomas microscópicos de bolsa ileal (Figura 9). Não foram observadas diferenças entre os tecidos avaliados, ou entre as biópsias das bolsas ileais.

Legenda: A. Tecido colônico; B. Intestino delgado; C. Bolsa ileal; D. Bolsa ileal com área de micro-adenoma. Observa-se em D maior acúmulo de beta-catenina em citoplasma na área de micro-adenoma em relação ao tecido normal.

Figura 9 – Estudo imunoistoquímico para a proteína beta-catenina.

A COX2 teve expressão predominantemente no citoplasma das células epiteliais, com intensidade semelhante em todas as amostras e entre todos os pacientes.

As reações imunoistoquímicas para Kras mantiveram um *background* em estroma e tecido muscular, após repetição. A expressão nos diversos tecidos foi semelhante.

A proteína CDX2 apresentou uma variabilidade importante entre os tecidos, possivelmente devido à sua dependência em relação à fixação do material. Nas amostras recentes de bolsa ileal, em todos os 16 pacientes, foi obtida forte intensidade de expressão. Já nas amostras antigas de íleo e de cólon, oriundas da peça cirúrgica, houve variação desde a negatividade até a expressão de forte intensidade. Contudo, houve predomínio da intensidade fraca, principalmente no cólon (5/7 pacientes). Apenas em um caso houve correspondência entre os três tecidos avaliados, com forte expressão no íleo, cólon e bolsa ileal.

A proteína APC demonstrou expressão fraca em seis amostras de tecido ileal pertencentes a segmentos coletados da peça cirúrgica. No cólon, houve predomínio de reação de intensidade moderada (4/7 pacientes). As reações das bolsas ileais acompanharam o íleo, com 11 das 16 amostras expressando intensidade fraca na reação.

Observando as áreas de micro-adenoma, não houve expressão de APC (Figura 10).

Legenda: A. Cólon; B. Intestino delgado; C. e D. Bolsa ileal, com aumento de 20x.

Figura 10 – Imunoistoquímica para APC.

Após a repetição da reação, houve expressão de p53 nas criptas da mucosa ileal e nas criptas basais da mucosa colônica. Na amostra de bolsa ileal, foi observada positividade nuclear nos micro-adenomas e ausência nas vilosidades. De um modo geral, houve predomínio da expressão de intensidade fraca nas diversas amostras, diferindo

apenas se as criptas estavam parcial ou totalmente coradas (Tabela 5).

Tabela 5 - Resultados da imunoistoquímica, de marcadores selecionados, em análise comparativa entre as amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

CASOS		2			3			7			8			11			14			15		
AMOSTRAS		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
Marcadores	COX2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	APC	+	+	+	+	++	++	+	++	+	+	++	+	+	+	+	++	+	NA	-	++	
	Catenina	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	K-ras	++	++	+	+	+	+	+	+	+	++	+	+	+	+	+	+	++	+	++	+	++
	p53	+	+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	+	-	-	1/2+	1/2+	1/2+	1/2+	+	+++	+	-	+
	bcl2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	CDX2	+++	+++	+++	+	+	+++	++	+	+++	-	-	+++	++	+	+++	+	+	+++	+	+	+++

NA - não-avaliável.

Foi realizado estudo imunoistoquímico, também para Ki67, no intuito de avaliar áreas de maior proliferação celular e compará-las com os resultados observados para p53 (Figura 11). Foi observada positividade nuclear apenas em bolsa ileal.

Legenda: A, C e E coradas com Ki67; B, D e F coradas com p53. As imagens E e F representam área de micro-adenoma. Observa-se expressão de maior intensidade nas áreas de micro-adenoma, com aumento de 40x.

Figura 11 – Imunoistoquímica, com marcadores selecionados, de tecido de bolsa ileal.

As PKC's expressaram resultados diferentes entre as estruturas, porém, semelhantes entre os tecidos (íleo, cólon e bolsa

ileal) e entre os pacientes. Foram realizados dois tipos de análises: uma específica ao tecido linfóide, devido à especificidade de expressão das PKC's, e outra nas áreas das criptas, vilosidades, microadenomas, tecido muscular e plexos mioentéricos. O tecido linfóide foi dividido em: tecido linfóide do córion, centro do folículo linfóide e periferia do folículo linfóide (Figura 12).

Legenda: A, B, C, D, E, F, H, I com aumento de 20x e G com aumento de 40x; A. Expressão da PKC alfa no folículo linfóide do cólon; B. Expressão da PKC alfa no folículo linfóide da bolsa ileal; C. Expressão da PKC alfa no tecido linfóide do córion; D. Expressão de PKC iota no folículo linfóide do cólon; E. Expressão da PKC iota no folículo linfóide da bolsa ileal; F. Expressão da PKC iota em micro-adenoma da bolsa ileal; G. Expressão da PKC lambda nas células de Paneth; H. Expressão de PKC lambda no folículo linfóide da bolsa ileal; I. Expressão da PKC lambda em micro-adenoma da bolsa ileal.

Figura 12 – Imunoistoquímica das PKC's, em tecidos selecionados.

A camada muscular própria foi avaliada no íleo e no cólon, pois a biópsia da bolsa ileal pode apresentar apenas *muscularis* da mucosa (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6 - Expressão das PKC's no tecido linfóide nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

CASOS		2			3			7			8			11			14			15		
AMOSTRAS		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
PKCa	Córon/ Tecido																					
	Linfóide	++	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	++	+	+++	++	+	++	+	++	+++	++	+++	+++
	Centro do Foliculo																					
	linfóide	++	+++	+	-	+	+	-	+	NA	+	+	NA	NA	+	+	+	+	+	+	NA	+
	Periferia do Foliculo																					
PKCδ	Linfóide	-	-	+++	++	+++	+++	++	+++	NA	+++	+++	+++	NA	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++
	Córon/ Tecido																					
	Linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Centro do Foliculo																					
	linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PKCε	Periferia do Foliculo																					
	Linfóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Córon/ Tecido																					
	Linfóide	+	+	++	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	++	-	+	+	+	+	+
	Centro do Foliculo																					
PKCα	linfóide	-	+	++	-	++	++	-	+	-	-	+	+	NA	+	+++	-	-	++	++	+	+
	Periferia do Foliculo																					
	Linfóide	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	-	-	NA	-	-	-	-	+	+	NA	NA
	Córon/ Tecido																					
	Linfóide	++	++	++	-	++	+++	+	++	+++	+	++	+++	++	++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++
PKCλ	Centro do Foliculo																					
	linfóide	-	+	+	-	+	+	+	+		+	+	+	NA	++	++	-	+	++	+++	+	+
	Periferia do Foliculo																					
	Linfóide	+	-	+	-	+	+	+	+	NA	-	-	+	NA	+	+	-	-	+	--	+	-
	Córon/ Tecido																					
PKCι	Linfóide	+++	+++	+++	+	+++	+++	++	+++	+++	+	++	++	+	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++
	Centro do Foliculo																					
	linfóide	++	-	++	++	+++	+++	++	++	-	++	++	NA	NA	++	++	+	++	++	+++	++	+++
	Periferia do Foliculo																					
	Linfóide	-	++	+++	+	++	++	-	-	-	+	++	NA	NA	+	+	-	+	-	++	NA	+

(-) negativo; (+) fraca; (++) moderada; (+++) forte; NA – não-avaliável.

Tabela 7 - Expressão das PKC's nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

CASOS		2			3			7			8			11			14			15		
AMOSTRAS		I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI	I	C	BI
PKCa	Cripta	++	+	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Vilosidade	++	NA	+	+	NA	+	-	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+
	Músculo	++	++	NA	++	++	NA	+	+	NA	++	+	NA	++	+	NA	+	+	NA	++	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCδ	Cripta	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vilosidade	+	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-	-	NA	-
	Músculo	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM	+++	+++	MM
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCε	Cripta	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
	Vilosidade	++	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	-	NA	+	+	NA	+	+	NA	+
	Músculo	+	+	NA	-	+	NA	+	+	NA	NA	-	NA	-	-	NA	+	+	NA	+	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	-	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCα	Cripta	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+	+	++	++	++	++	+++	++	++	++	++	++
	Vilosidade	++	NA	++	++	NA	++	++	NA	++	++	NA	+++	++	NA	++	++	NA	++	+	NA	++
	Músculo	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
PKCι	Paneth	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++	+++	NA	+++
	Cripta	+++	++	++	++	++	++	++	+	++	+	++	++	+	++	++	+	++	+++	++	++	++
	Vilosidade	+++	NA	+	++	NA	++	++	NA	++	+	NA	++	+	NA	++	+	NA	+++	++	NA	++
	Músculo	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA	+	+	NA
	Adenoma	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	++	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

(-) negativo; (+) fraca; (++) moderada; (+++) forte; NA – não-avaliável;

MM - muscular da mucosa.

A PKC alfa teve expressão de fraca intensidade, com padrão semelhante, nas criptas do íleo, do cólon e da bolsa ileal. As vilosidades presentes no íleo e na bolsa ileal expressaram PKC alfa com fraca intensidade em 91% das amostras.

O tecido muscular do íleo teve moderada intensidade de expressão em 5/7 pacientes, enquanto o tecido muscular do cólon teve reação de intensidade fraca em 5/7 pacientes. Houve expressão da PKC alfa apenas na área de micro-adenoma da bolsa ileal. Já em relação ao tecido linfóide, a PKC alfa apresentou uma particularidade, corando com maior intensidade os linfócitos do córion e da periferia dos folículos, em relação à porção central destes. O padrão do tecido linfóide foi igual nas amostras de íleo, cólon e bolsa ileal.

A PKC delta foi a mais específica das PKC's, pois corou fortemente tecido muscular de vasos, camada muscular própria e muscular da mucosa. Os plexos mioentéricos não demonstraram positividade. Em apenas um caso, houve expressão em criptas e vilosidades, o que pode ser fundo da reação. O tecido linfóide teve expressão negativa em todos os casos (Figura 13).

Legenda: A. aumento de 10x; B, C, D, E e F aumento de 40x; A. e B. Expressão na camada muscular da mucosa; C. Expressão na camada muscular própria; D. Expressão na musculatura do vaso; E. Expressão nos feixes musculares ao redor das criptas; F. Plexo mioentérico negativo em meio a tecido muscular positivo.

Figura 13 – Imunoistoquímica da PKC delta, em tecidos selecionados.

A PKC epsilon, ao contrário da PKC delta, apresentou-se como a mais inespecífica das PKC's, sem um tecido ou estrutura de destaque em sua expressão. As criptas expressaram reação de fraca intensidade em mais ou menos 50% das amostras, sem diferença entre íleo, cólon e bolsa ileal. As vilosidades do íleo e da bolsa ileal tiveram padrão semelhante, com reação de fraca intensidade em 85% das amostras. O tecido muscular teve expressão apenas em camada muscular própria, tanto em cólon como em íleo, e plexo mioentérico positivo. Em relação ao tecido linfóide, não foi obtido nenhum padrão de expressão, tendo intensidades variadas em córion e folículo.

A PKC lambda apresentou algumas características interessantes. Nas criptas e nas vilosidades, houve predominantemente reação de moderada intensidade, sem diferença entre os tecidos ou entre os pacientes. Observou-se, porém, em íleo e bolsa ileal, presença de escassas células na porção basal da cripta, que se destacavam por apresentar maior intensidade da reação em relação ao restante da cripta. Pela hematoxilina-eosina percebeu-se que se tratava de células de Paneth. No cólon, a reação foi negativa, possivelmente porque as amostras são provenientes do cólon descendente, que não possui células de Paneth. As áreas de microadenomas tiveram expressão com moderada intensidade. O tecido muscular apresentou-se negativo na grande maioria das amostras, e o plexo mioentérico, positivo. Em relação ao tecido linfóide, o córion

destacou-se expressando reação de forte intensidade, frente a uma expressão de fraca intensidade no folículo, sem diferenças entre íleo, cólon e bolsa ileal.

A PKC ι apresentou uma expressão moderada nas criptas (70%), sem diferença entre os tecidos. Nas vilosidades do íleo e da bolsa ileal, observou-se uma tendência de maior expressão em bolsa ileal do que em íleo oriundo da peça cirúrgica. Houve expressão moderada em bolsa ileal (13/16 pacientes) e fraca em íleo (3/7 pacientes). O tecido muscular encontrava-se positivo em todas as amostras, e onde o plexo mioentérico foi identificado, apresentava-se positivo. As áreas de micro-adenomas foram todas negativas para PKC ι . Em relação ao tecido linfóide, a PKC ι corou o córion e a porção central do folículo com mais intensidade do que a periferia, estabelecendo um padrão de expressão. Não houve diferença entre os tecidos (íleo, cólon, bolsa ileal), nem entre os pacientes.

Em última análise, a expressão imunoistoquímica na mucosa da bolsa ileal demonstrou: a PKC α com expressão nas vilosidades, criptas e tecido linfóide. Neste, houve intensa expressão no córion e na periferia do folículo; a PKC λ com expressão nas vilosidades, criptas, tecido linfóide e nas células de Paneth. No tecido linfóide, expressão mais intensa no córion; a PKC δ não teve expressão em vilosidades, criptas e/ou tecido linfóide, mas sim, especificamente,

em tecido muscular; a PKC ϵ com expressão nas vilosidades, criptas e tecido linfóide; a PKC ι com expressão nas vilosidades, criptas e tecido linfóide. Neste, a expressão foi mais intensa no córion e no centro do folículo; houve expressão de β -catenina nas membranas das vilosidades e nas criptas, com discreto borramento do citoplasma; houve expressão da proteína p53 nos núcleos das células das criptas basais; houve expressão de K-ras, APC, bcl-2, COX2, MUC2 e CDX2 em vilosidades e criptas; não ocorreu a expressão de MUC1, MUC2 e MUC5AC.

No estudo comparativo entre a peça cirúrgica inicial e as biópsias recentes, realizadas nas bolsas ileais, houve semelhança de expressão dos seguintes marcadores: PKC's α , λ , δ , ϵ , ι , beta-catenina, K-ras, p53, APC, bcl-2, COX2, MUC 1, MUC 5AC E MUC 6. Apenas MUC2 e CDX2 apresentaram uma maior expressão em bolsa ileal.

A avaliação das alterações histológicas na mucosa da bolsa ileal demonstrou atrofia das vilosidades em 11/16 pacientes e aumento no número de criptas em mucosa de bolsa ileal, em comparação ao íleo, em 4/7 pacientes.

Este estudo ainda não foi publicado, pois está em fase final de análise de dados, com a contribuição fundamental da Dra. Renata Coudry e do Prof. Dr. Fernando Soares.

Voltando a meados da década de 1990, tínhamos no RCCH um grande número de pacientes jovens, portadores de CCR, com antecedentes familiares de câncer.

Com a publicação dos critérios de Amsterdam, em 1991, houve uma padronização internacional na classificação dos pacientes de famílias com CCR hereditário sem polipose, ou HNPCC. Esse foi o grande mérito dos critérios de Amsterdam, apesar das críticas recebidas por ser muito restritivo, deixando de fora famílias fortemente suspeitas de serem portadoras de predisposição hereditária ao câncer.

Nossa posição foi registrar as famílias típicas, de acordo com os referidos critérios, mas também registrar todas as famílias e indivíduos suspeitos, que não preenchiam os critérios. Realizamos uma classificação própria do RCCH, mais abrangente:

- ✓ Critérios de Amsterdam menos um;
- ✓ Agrupamento familiar de CCR ou tumores associados ao HNPCC, mas não-característico;
- ✓ Pacientes com idade menor que 50 anos, sem antecedentes familiares.

Utilizando essa classificação, houve um aumento rápido do número de famílias e indivíduos registrados, pois era comum preencher ao menos um dos critérios supracitados.

Em 1997, com a publicação dos critérios de Bethesda, muito mais sensíveis e abrangentes que os critérios de Amsterdam, nosso registro já possuía dezenas de famílias com as novas características propostas.

A finalidade principal dos critérios de Bethesda foi justamente não restringir o rastreamento para o diagnóstico clínico e molecular, imposto pelos critérios de Amsterdam. Os novos critérios não visavam fazer o diagnóstico clínico da síndrome de Lynch, mas sim levantar suspeitas para iniciar a investigação familiar e os testes moleculares de rastreamento, que estavam sendo desenvolvidos.

Em meados da década de 1990, foram descritos os principais genes de reparo envolvidos com a SL. Além disso, a instabilidade de microssatélites (MSI), uma alteração fenotípica no tecido tumoral colorretal, causada pela falha dos genes de reparo, ficou estabelecida como teste de rastreamento para os pacientes que preenchiam os critérios de Bethesda.

Na época, nós, cirurgiões formados já há algum tempo, fazíamos um grande esforço para suprir a deficiência, em nossa

formação, na Área da biologia molecular. Procurávamos nos atualizar e ler o máximo possível, mas havia muita dificuldade, pois, entre os dois extremos, a cirurgia e a biologia molecular, havia uma distância muito grande. As leituras eram muito especializadas e técnicas para a grande maioria dos médicos. Por isso, organizei, em 1999, juntamente com o Dr. Mauro Pinho, um livro sobre biologia molecular básica e genética do câncer. Graças à colaboração de vários especialistas, nosso objetivo de tornar o assunto mais acessível foi cumprido com a publicação de Genética e Biologia Molecular para o Cirurgião, pela editora LEMAR (ROSSI e PINHO 1999).

Em 1997, teve início nosso primeiro projeto de pesquisa envolvendo uma família com síndrome de Lynch, com preenchimento dos critérios de Amsterdam e presença de vários casos de CCR em 3 gerações diferentes (Figura 14). Foi identificada, pela primeira vez no Brasil, uma mutação no gene *MSH2*, inicialmente no probando com CCR, e, posteriormente, em outros parentes de primeiro grau com câncer e portadores assintomáticos. Tratava-se de uma mutação nova, ainda não descrita na literatura, sendo o resultado publicado em 1999 (CORVELLO et al. 1999). A mutação referia-se a uma deleção de “G”, no nucleotídeo 1.249, provocando uma mutação *frameshift*, com um *stop* no códon 437 (Anexo 3).

Figura 14 – Heredograma da família C, com vários casos de CCR, em 3 gerações, incluindo um casamento co-sangüíneo entre primos (probando).

Após esse resultado, o estudo prosseguiu, com a inclusão de uma segunda família (família A – Figura 15), também com três gerações. Foi identificada mutação em três de quatro irmãos. Era uma mutação tipo *nonsense* no gene *MSH2*, causada por uma troca de um “G” por um “A”, no códon 666, com substituição de um triptofano por um *stop* códon.

Figura 15 – Heredograma da família A, com 3 gerações, sendo que a segunda teve seus quatro membros estudados, 3 deles portadores da predisposição e com CCR.

Essa família é um exemplo prático da importância de identificar a predisposição hereditária ao câncer. Por meio do diagnóstico de portadores, identificamos indivíduos da geração seguinte sob risco, além de orientar o risco de transmissão para a prole.

O estudo prosseguiu e foram incluídas mais 23 famílias, agora não apenas portadoras de SL, com critérios de Amsterdam preenchidos, mas também aquelas com suspeita clínica, ou seja, com critérios de Bethesda preenchidos. Todas essas famílias eram provenientes do RCCH. O principal objetivo era o seqüenciamento dos dois principais genes de reparo envolvidos com a síndrome: *MLH1* e *MSH2*. O estudo foi realizado em conjunto com o Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, de São Paulo, coordenado pelo Dr. Andrew Simpson. Foram identificadas mais 8 mutações nas 23 famílias, sendo que apenas uma já havia sido publicada por outros autores (Figura 16). A publicação dos resultados, totalizando 25 famílias estudadas, foi feita em 2002 (ROSSI et al. 2002a) (Anexo 4). Foi um trabalho pioneiro realizado com famílias brasileiras com suspeita de SL.

TABLE 1. *hMLH1 and hMSH2 mutations in Brazilian families with suspected HNPCC*

Patient No.	Age (y)/sex	Proband			Family history	CRC staging, TNM (1997)	Mutation					
		CRC location	Other tumors				MMR gene	Exon	Codon	Nucleotide change	Consequence	Reference
1	38/F	Rectum	No	Father: lymphoma Uncle: CRC	T3N2M0G1	hMLH1	11	338	A → G at nt 1013	Asn → Ser (missense)	New	
2	60/F	Right colon	No	Sister: breast 3 nephews: 2 gastric, 1 pancreas	Unknown	hMLH1	13	500/501	Del TCA at nt 1499–1501	In-frame	New	
3	42/F	Right colon Left colon	No	No	Villous T1N0M0G1 Villous T1N0M0G1	hMLH1	Intron 13	–	G → T at nt 1558 +1	Splice defect	Unpublished (ICG-HNPCC)	
4	70/M	Rectum	No	Sister: colon 2 nephews: gastric	T2N0M0G2	hMLH1	16	603	C → G at nt 1808	Pro → Arg (missense)	New	
5	42/F	Rectum	No	No	T2N0M0G2	hMLH1	16	618	A → C at nt 1853	Lys → Thr (missense)	27	
6	42/M	Right colon	No	Amsterdam II	Unknown	hMLH1	18	666	G → A at nt 1998	Trp → Stop (nonsense)	New	
7	27/M	Rectum	No	Adopted	Unknown	hMLH1	19	718	C → T at nt 2152	His → Tyr (missense)	New	
8	55/M	Rectum	No	Grandmother: colon at 45 y	T2N0M0G1	hMLH1	19	718	C → T at nt 2152	His → Tyr (missense)	New	
9	41/F	Right colon	No	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	hMSH2	7	417	Del G at nt 1249	Frameshift Stop at codon 437	28	
10	40/F	Right colon	Colon adenoma, bladder carcinoma	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	hMSH2	11	556	Ins A at nt 1667	Frameshift Stop at codon 561	New	
11	52/M	Rectum	Melanoma	Father: colon Sister: rectum Sister: ovary	T2N0M0G1	No						
12	42/M	Left colon	Multiple colon adenomas, skin adenomas	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	No						
13	63/F	Left colon	No	Amsterdam I	T3N0M0G2	No						
14	55/F	Left colon	No	Uncle: colon Uncle: uterus ^a	T1N1M0G2	No						
15	45/M	Right colon	No	No	T4N0M0Gx	No						
16	65/M	Rectum	No	Amsterdam I	T3N1M0G2	No						
17	33/F	Rectum	No	One generation: 5 brothers: CRC 1 sister: uterus	T1N0M0G1	No						
18	36/M	Right colon	No	Mother: uterus ^a	T3N0M0Gx	No						
19	64/M	Rectum	No	Two first-degree: CRC	T1N0M0G1	No						
20	29/M	Right colon	No	No	T2N0M0G2	No						
21	28/M	Right colon	No	No	T3N0M0G2	No						
22	45/M	Rectum	No	Uncle: rectum	T4N0M0G2	No						
23	69/M	Rectum	Multiple colon adenomas, renal carcinoma	Unknown	T2N0M0G1	No						
24	18/F	Left colon	No	No	T3N0M0G2	No						
25	53/M	Left colon	No	Father: gastric Sister: uterus ^a (M: liver)	T3N0M1Gx	No						

HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; CRC, colorectal cancer; nt, nucleotide; ICG-HNPCC, International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer; Del, deletion; Ins, insertion; TNM, tumor-node-metastasis; MMR, mismatch repair.

^a Doubt: endometrium or cervix.

Fonte: ROSSI et al. (2002a).

Figura 16 – Resultados da publicação realizada em 2002, sobre síndrome de Lynch, em famílias brasileiras.

Todos esses novos conhecimentos estimularam o crescimento do RCCH, com um grande aumento no número de famílias registradas. Realizamos, na época, uma revisão sobre SL, publicada em literatura nacional, com o intuito de divulgar o tema entre médicos no país (ROSSI et al. 2002b) (Anexo 5).

Iniciamos, em 2000, um levantamento das famílias do RCCH e das ocorrências de tumores. O desenvolvimento do projeto visava analisar a frequência de tumores extracolônicos nas famílias com suspeita de CCR hereditário sem polipose, revisando e atualizando os dados das famílias pertencentes ao RCCH. De acordo com as características da SL, incluindo os critérios de Amsterdam, os tumores extracolônicos relacionados são: endométrio, intestino delgado, vias excretoras urinárias, estômago, ovário, além dos carcinomas sebáceos.

Nossos resultados mostraram que, nos homens, o tumor mais freqüente foi o de estômago. Mas, para nossa surpresa, nas mulheres, o tumor mais freqüentemente encontrado, ao lado de endométrio, foi mama, que não faz parte do espectro da síndrome de Lynch. Esse trabalho, publicado em 2004, foi tema de trabalho de conclusão do curso de Biologia, na Universidade Mackenzie, além de ter sido apresentado em congresso internacional (Figuras 17A, 17B e 17C) (OLIVEIRA FERREIRA et al. 2004) (Anexo 6).

Table 1. Number of CRC and extra-colonic tumors in HNPCC and FCC Brazilian families.

HNPCC																	
FCC																	
Fam	Male				Female				Fam	Male				Female			
	Number of generations	N	N CRC	N extra-colonic tumors	N	N CRC	N extra-colonic tumors	Number of generations		N	N CRC	N extra-colonic tumors	N	N CRC	N extra-colonic tumors		
1	5	70	4	0	70	8	1	4	1	19	0	1	29	2	0		
2	5	23	1	0	31	6	2	2	3	2	2	0	1	1	0		
3	4	35	2	4	21	2	3	3	4	28	1	4	25	1	3		
4	5	31	3	2	48	3	4	5	4	11	2	2	10	2	0		
5	5	19	2	0	16	2	5	3	5	3	1	0	8	2	0		
6	4	16	3	0	18	1	6	3	6	3	1	2	3	0	1		
7	3	5	4	0	21	0	7	5	7	44	1	1	51	2	2		
8	4	19	2	0	20	1	8	4	8	17	2	0	24	2	1		
9	5	7	2	2	22	4	9	5	9	18	0	1	18	3	3		
10	4	19	0	6	17	4	10	3	10	18	1	0	12	1	0		
11	3	11	1	5	10	4	11	4	11	13	1	2	13	1	1		
12	5	53	0	0	65	4	12	4	12	14	0	2	14	2	0		
13	3	6	1	0	12	2	13	4	13	17	2	0	14	1	0		
14	4	29	2	0	30	2	14	5	14	19	2	0	6	0	1		
15	4	11	0	2	11	2	15	4	15	27	1	4	35	3	1		
16	4	26	3	0	20	0	16	4	16	19	0	4	25	0	5		
17	4	7	6	0	8	1	17	3	17	16	3	0	17	0	1		
18	5	35	5	0	27	6	18	3	18	19	0	1	19	1	1		
19	5	10	2	0	11	3	19	4	19	22	1	5	31	0	6		
20	4	38	1	4	40	3	20	3	20	0	0	0	3	2	2		
21	4	23	1	5	27	4	21	5	21	17	3	1	7	1	0		
22	4	23	3	5	21	1	22	2	22	4	2	0	3	0	0		
23	3	0	0	0	4	2	23	4	23	10	2	2	7	0	0		
24	4	8	1	0	11	2	24	4	24	10	0	2	15	4	3		
25	4	14	1	0	23	5	25	4	25	8	0	0	13	2	0		
26	4	19	0	1	16	4	26	4	26	17	0	2	18	1	2		
27	4	12	2	0	14	1	27	4	27	13	0	6	9	2	2		
28	4	12	1	1	8	1	28	5	28	16	2	1	24	1	0		
29	4	8	2	0	10	4	29	4	29	7	0	0	10	2	1		
Total		589	55	37	652	82	Total		Total	505	33	47	548	42	36		
					49												

HNPCC – hereditary non-polyposis colorectal cancer; FCC – familial colorectal cancer; Fam – families; CRC – colorectal cancer.
Source: Hereditary Colorectal Cancer Registry, Department of Pelvic Surgery, Hospital do Cancer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil (January 1998–June 2001).

Fonte: OLIVEIRA FERREIRA et al. (2004).

Figura 17A – Número de tumores colorretais e extracolônicos encontrados.

Fonte: OLIVEIRA FERREIRA et al. (2004).

Figura 17B - Número de tumores extracolônicos encontrados nas famílias classificadas pelos critérios de Amsterdam como SL.

Fonte: OLIVEIRA FERREIRA et al. (2004).

Figura 17C - Número de tumores extracolônicos encontrados nas famílias classificadas como CCR familiar (CCF - critérios de Amsterdam menos um).

Com a oficialização do Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários (GBETH), em fevereiro de 2003, houve uma maior divulgação do tema entre os profissionais de saúde da Área. Creio que, em grande parte pela criação do *site* do grupo (www.gbeth.org.br), no qual é colocado, até hoje, o conteúdo das reuniões oficiais semanais, que, desde o início, têm sido transcritas em forma de *newsletters* pela Enfermeira de Pesquisa Érika Santos. Recentemente, remodelamos a apresentação do *site* do GEBTH, tendo como principais objetivos: modificar o nome do para Grupo de Estudos de Tumores Hereditários (www.geth.org.br); ampliar as possibilidades de interação entre os profissionais, dentro da área restrita por *login* e senha; e traduzir o conteúdo para inglês e espanhol.

Atualmente, temos um extenso conteúdo disponível *on-line* sobre tumores hereditários, e nossa idéia é enriquecer esse conteúdo ao longo do tempo, com um trabalho contínuo, conforme as reuniões são realizadas e transcritas. Nas Figuras 18A e 18B, observamos o movimento de acessos ao site do grupo no mês de julho de 2008.

Relatório: Países - geth1 Intervalo: 01/07/2008 - 31/07/2008			
Países (1-10) / 48	Sessões	%
1. br (Brazil)	3.457	36,97%
2. (no entry)	2.234	23,89%
3. com (Commercial)	1.849	19,77%
4. net (Network)	1.197	12,80%
5. pt (Portugal)	314	3,36%
6. cn (China)	90	0,96%
7. de (Germany)	68	0,73%
8. ru (Russian Federation)	24	0,26%
9. pl (Poland)	12	0,13%
10. uk (United Kingdom)	9	0,10%
Ver Total:	9.254	98,95%	
Total:	9.352	100,00%	

Observação: Informações de Ajuda – Países

Este relatório mostra domínios de alto nível com ênfase em filiação política, ordenados por Sessões. Como a maior parte do tráfego web tem origem em domínios .net, .com, e .org (a maioria nos USA), eles são incluídos. As outras entradas correspondem a códigos de países, o que na maioria dos casos são indicadores confiáveis da origem do tráfego (mesmo que alguns vendam domínios a qualquer um). O termo *(no entry)* inclui todos os endereços IP não identificados.

Urchin 5 ©2005 Urchin Software Corporation

Figura 18A - Demonstrativo do movimento de acessos ao site do GETH em julho de 2008.

Logado	Componente	Popular	Últimos	Menu
Itens Populares		Criado	Acessos	
Neurofibromatose Tipo 1		2005-06-23 00:00:00	9627	
Terapia Genética I		2005-03-03 00:00:00	4870	
Caso clínico: Carcinoma Renal Familiar		2006-03-06 00:00:00	4178	
Xeroderma Pigmentoso		2005-06-23 00:00:00	3843	
Sequenciamento do DNA		2005-06-26 00:00:00	3684	
Alguns "Passos" da Carcinogênese		2005-06-26 00:00:00	3438	
Caso Clínico: Esclerose Tuberosa		2005-06-23 00:00:00	3254	
Carcinoma de Células Renais Familiar		2005-06-26 00:00:00	2843	
Caso clínico: Síndrome de Gorlin-Goltz		2005-03-15 00:00:00	2744	
Polipose Adenomatosa Familiar Recessiva		2005-06-23 00:00:00	2729	

Figura 18B - Demonstrativo dos conteúdos mais acessados.

Outro importante passo para a disseminação de informações sobre tumores hereditários, entre profissionais da Área, foi a publicação de dois livros de atualizações do GBETH: 2003/2004 e 2005/2006.

O primeiro livro contém os resumos de 80 reuniões do grupo, sendo que 37 delas versam sobre temas relacionados ao CCR com predisposição hereditária. No segundo livro, outras 80 reuniões estão transcritas, coincidentemente, também com 37 delas relacionadas ao CCR com predisposição hereditária. Estamos, atualmente, preparando o terceiro volume, que pretendemos editar no primeiro semestre de 2009, contendo, também, cerca de 80 reuniões transcritas.

Com o crescente interesse de profissionais da América Latina no GETH, muitos deles passaram a fazer parte do grupo, inclusive com funções na administração para o biênio 2007-2008: Dr.Alejandro Giraldo, da Colômbia; Dr.Carlos Vaccaro, da Argentina; Dr.Carlos Sarroca, do Uruguai; Dr.Francisco Lopez-Koestner, do Chile. Todos são estudiosos do CCR com predisposição hereditária, e autores da grande maioria das publicações oriundas da América Latina sobre o tema.

Nosso interesse em estudar câncer colorretal aumentava, principalmente com o foco nos casos suspeitos de predisposição hereditária.

Quando organizamos o livro Câncer de Cólon, Reto e Ânus, publicado em 2005, pelas editoras Tecmedd e LEMAR, elaboramos uma seção dedicada apenas ao CCR hereditário, levando em conta a importância do tema. Apesar de termos contado com a colaboração de experientes profissionais estrangeiros, a publicação foi realizada em português, com nossa própria tradução.

O capítulo sobre o histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose, ou síndrome de Lynch, foi coordenado pelo próprio Henry Lynch, em colaboração com Trudy Shaw, Jane Lynch e Willian Grady (LYNCH et al. 2005).

John Burn e Fiona Douglas escreveram sobre as características das síndromes de Lynch e de Muir-Torre (DOUGLAS e BURN 2005). O capítulo sobre agregação familiar de câncer ficou a cargo de José Cláudio Casali da Rocha (ROCHA 2005).

O capítulo sobre polipose adenomatosa familiar (FAP), e suas variantes, síndromes de Gardner e Turcot, foi escrito por James Church e Victor Fazio (CHURCH, FAZIO 2005).

A coordenação do capítulo sobre síndrome de Peutz-Jeghers foi realizada por José Guillem, em colaboração com David Chessin e Arnold Markowitz (CHESSIN et al. 2005). Carol Burke escreveu sobre polipose juvenil (BURKE 2005).

As poliposes intestinais pouco comuns foram abordadas por Bernardo Garicochea e Guilherme Cotti (GARICOCHEA e COTTI 2005). E, finalmente, o capítulo sobre o tratamento cirúrgico do câncer colorretal hereditário foi escrito por mim, em conjunto com Fabio Ferreira (ROSSI et al. 2005).

Paralelamente à organização do livro, alguns trabalhos colaborativos com a Universidade Federal de Minas Gerais estavam em andamento, sob a coordenação do Professor Sergio Pena. O foco principal de tais pesquisas era a metilação gênica e a instabilidade de microssatélites (MSI).

Um dos trabalhos visava avaliar qual o significado clínico-patológico da instabilidade do marcador mononucleotídico BAT26 em pacientes portadores de CCR operados. Após a avaliação de 184 casos, a instabilidade de BAT26 teve correlação clínica significativa com tumores proximais do cólon (Figura 19A), e correlação patológica

significativa com componente mucinoso e lesões indiferenciadas (Figura 19B) (CARVALHO et al. 2005) (Anexo 7).

Table 1 – Clinical characteristics of colorectal cancer patients according to BAT26 status

Characteristic		Stable	Instable	Total	p*
Age	≤ 60 y.o.	72 (44.4%)	7 (31.8%)	79 (42.9%)	0.359
	> 60 y.o.	90 (55.6%)	15 (68.2%)	105 (57.1%)	
Gender	Men	72 (44.4%)	6 (27.3%)	78 (42.4%)	0.168
	Women	80 (55.6%)	16 (72.7%)	106 (57.6%)	
HNPCC	No	160 (98.8%)	18 (81.8%)	178 (96.7%)	0.002
	Yes	2 (1.2%)	4 (18.2%)	6 (3.3%)	
Tumor location	Proximal	29 (17.9%)	18 (81.8%)	47 (25.5%)	<0.001
	Distal	133 (82.1%)	4 (18.2%)	137 (74.5%)	
Type of surgery	Curative	132 (81.5%)	21 (95.5%)	153 (83.2%)	0.132
	Paliative	30 (18.5%)	1 (4.5%)	31 (16.8%)	
CEA**	≤ 5 'g/L	64 (62.7%)	11 (73.3%)	75 (64.1%)	0.587
	> 5 'g/L	38 (37.3%)	4 (26.7%)	42 (35.9%)	
CA19.9***	≤ 37 U/ml	72 (84.7%)	9 (81.8%)	81 (84.4%)	0.681
	> 37 U/ml	13 (15.3%)	2 (18.2%)	15 (15.6%)	
Recurrence#	No	102 (79.1%)	19 (90.5%)	121 (80.7%)	0.370
	Yes	27 (20.9%)	2 (9.5%)	29 (19.3%)	

* p: Fisher exact test; ** 67 patients without information; *** 88 patients without information; # pacientes submmited to palliative surgery were excluded

Fonte: CARVALHO et al. (2005).

Figura 19A – Correlação entre variáveis clínicas e instabilidade de BAT26.

Table 2 – Pathological characteristics of colorectal tumors according to BAT26 status

Characteristic		Stable	Instable	Total	p*
T stage**	1 and 2	44 (27.5%)	3 (14.3%)	47 (26.0%)	0.290
	3 and 4	116 (72.5%)	18 (85.7%)	134 (74.0%)	
N status**	Negative	98 (61.6%)	12 (54.5%)	110 (60.8%)	0.642
	Positive	61 (38.4%)	10 (45.5%)	71 (39.2%)	
M status	Negative	127 (78.4%)	21 (95.5%)	148 (80.4%)	0.082
	Positive	35 (21.6%)	1 (4.5%)	36 (19.6%)	
Differentiation***	Well/	155 (98.1%)	19 (86.4%)	174 (96.7%)	0.025
	Moderate				
	Poor	3 (1.9%)	3 (13.6%)	6 (3.3%)	
Venous invasion [§]	No	114 (72.6%)	18 (81.8%)	132 (73.7%)	0.445
	Yes	43 (27.4%)	4 (18.2%)	47 (26.3%)	
Lymphatic invasion [§]	No	77 (49.0%)	13 (59.1%)	90 (50.3%)	0.496
	Yes	80 (51.0%)	9 (40.9%)	89 (49.7%)	
Neural invasion ^{§§}	No	107 (69.9%)	19 (86.4%)	126 (72.0%)	0.132
	Yes	46 (30.1%)	3 (13.6%)	49 (28.0%)	
Mucinous component	No	147 (90.7%)	15 (68.2%)	162 (88.0%)	0.007
	Yes	15 (9.3%)	7 (31.8%)	22 (12.0%)	

*p: Fisher exact test; ** 3 patients without information; *** 4 patients without information; [§] 5 patients without information; ^{§§} 9 patients without information

Fonte: CARVALHO et al. (2005).

Figura 19B – Correlação entre variáveis patológicas e instabilidade de BAT26.

Outros dois trabalhos, relacionados entre si, também foram desenvolvidos em conjunto com o mesmo grupo de pesquisadores da Universidade Federal de Minas Gerais. Um deles refere-se ao desenvolvimento e à aplicação de um procedimento *multiplex*, utilizando apenas uma reação de PCR para a detecção de metilação de DNA em um painel com cinco diferentes genes (os genes supressores de tumor: *p16^{INK4a}*, *death-associated protein kinase DAPK* e *p14^{ARF}*; e os genes de reparo: *O⁶-methylguanina-DNA-methyltransferase MGMT* e *MLH1*) (ANACLETO et al. 2005a) (Anexo 8).

O outro trabalho versou sobre a utilização do painel de cinco marcadores para a detecção de metilação em 106 pacientes portadores de CCR operados. Houve correlação significativa entre a presença de três ou mais *loci* metilados e tumores proximais no cólon, porém, quando se excluía a metilação do gene *MLH1*, ou MSI, de acordo com o painel de cinco marcadores, proposto pelos critérios de Bethesda, a significância estatística desaparecia. Houve forte correlação entre tumores proximais no cólon e MSI (Figura 20). Esses achados demonstram que o fenótipo relacionado à localização proximal do CCR, nesse grupo de 106 pacientes, está relacionado não ao fenótipo metilador do painel de genes, mas sim à MSI, ou à metilação de *MLH1* (ANACLETO et al. 2005b) (Anexo 9)

Table 1. Values of *P* (Two-Tailed) from Several Pairwise Comparisons Using Fisher's Exact Test.

	<i>hMLH1</i> Methylation		MSI		Location		Recurrence within 3 Years	
	+	-	+	-	Proximal	Distal	+	-
MSI	+	8	7					
	-	11	80					
	<i>P</i> = .0008*							
Location	Proximal	9	13	Proximal	9	13		
	Distal	8	62	Distal	5	65		
	<i>P</i> = .004*			<i>P</i> = .0005*				
Recurrence within 3 years	+	1	12	+	2	11	+	3
	-	14	60	-	12	62	-	19
	<i>P</i> = .295			<i>P</i> = .652		<i>P</i> = .563		
≥2 Methylated loci	+	14	16	+	7	23	+	10
	-	5	71	-	8	68	-	12
	<i>P</i> = .000006*			<i>P</i> = .086		<i>P</i> = .029		
≥3 Methylated loci	+	8	5	+	4	9	+	6
	-	11	82	-	11	82	-	16
	<i>P</i> = .0002*			<i>P</i> = .083		<i>P</i> = .011*		
							<i>P</i> = .415	
							+	0
							-	13
								80

Proximal = proximal to the splenic flexure; Distal = distal to the splenic flexure.

*Statistically significant after Bonferroni correction for multiple comparisons.

Fonte: ANACLETO et al. (2005b).

Figura 20 – Correlação da metilação de *MLH1* e MSI com a localização proximal do CCR no cólon.

Outro estudo, complementar aos acima apresentados, visou avaliar a relação do polimorfismo C677T da enzima termolábil MTHFR (*methylenetetrahydrofolatereductase*) com a metilação da região promotora de alguns genes (supressores de tumor: *p16^{INK4a}*, *death-associated protein kinase DAPK* e *p14^{ARF}*; genes de reparo *O⁶-methylguanina-DNA-methyltransferase MGMT* e *MLH1*) e com MSI, em 106 pacientes operados, portadores de CCR. Tal polimorfismo causa a troca de uma alanina, conservada em termos evolutivos, por uma valina. Isso faz com que as variantes 677TT e 677CT tenham, respectivamente, 30% e 65% menor atividade de MTHFR. Esses polimorfismos parecem diminuir a capacidade de metilação gênica, e, conseqüentemente, diminuir a suscetibilidade ao CCR. Essa capacidade depende da atividade de folato, não sendo, portanto, evidente em pacientes consumidores de grandes quantidades de álcool. Outro fato interessante é que esses polimorfismos podem variar de acordo com a ancestralidade, variando com a região geográfica. Por isso, foram estudados 40 polimorfismos bialélicos para caracterizar a amostra quanto à ancestralidade genômica. O painel de microssatélites estudado foi o proposto pelos critérios de Bethesda, com cinco marcadores. Foram avaliados também 150 controles saudáveis, com o intuito de comparar os polimorfismos encontrados na amostra de pacientes (Figura 21) (CLARIZIA et al. 2006) (Anexo 10).

Table 1. Genotype frequencies of MTHFR C677T polymorphism in patients with colorectal cancer and in controls.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	P
Controls	137 (91)	13 (9)	-	-	-
Cases	91 (86)	15 (14)	1.74	0.47-4.10	0.17

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

Fonte: CLARIZIA et al. 2006).

Figura 21 – Frequência dos polimorfismos da MTHFR em pacientes portadores de CCR e controles saudáveis.

Conforme pode ser observado nas Figuras 20A e 20B, não houve correlação entre os polimorfismos de MTHFR e as características clínicas e a metilação aberrante dos genes avaliados.

Table 2. The MTHFR C677T polymorphism and clinicopathological features of patients with colorectal cancer.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	P
Men (N = 41)	36 (88)	5 (12)	-	-	-
Women (N = 50)	43 (86)	7 (14)	1.17	0.30 - 4.72	0.80
Age >70 (N = 36)	29 (81)	7 (19)	-	-	-
Age < 70 (N = 55)	50 (91)	5 (9)	2.41	0.61 - 9.82	0.20
Duke A (N = 15)	13 (87)	2 (13)	1.00	-	-
Duke B (N = 38)	32 (84)	6 (16)	1.22	0.18 - 10.10	0.99
Duke C (N = 37)	32 (86)	5 (14)	1.02	0.14 - 8.74	0.99

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

For Duke's stages (A, B, C), see Williams and Beart, 1992.

Fonte: CLARIZIA et al. (2006).

22A

Table 3. The MTHFR C677T polymorphisms and aberrant DNA methylation of five tumor-associated genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*).

	CC + CT	TT	OR	95% CI	P
Not methylated	41	8	1	-	-
<i>hMLH1</i> methylated	15	4	1.37	0.29 - 6.12	0.72
<i>DAPK</i> methylated	20	1	0.26	0.01 - 2.30	0.26
<i>p16^{INK4a}</i> methylated	14	3	1.10	0.20 - 5.57	0.99
<i>p14^{ARF}</i> methylated	10	4	2.05	0.41 - 9.87	0.43
<i>MGMT</i> methylated	25	5	1.02	0.26 - 4.00	0.99
>3 loci methylated (10)	7	3	2.20	0.36 - 12.84	0.37
>2 loci methylated (26)	21	5	1.22	0.30 - 4.85	0.75
>1 locus methylated (57)	50	7	0.72	0.72 - 2.42	0.55

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

Fonte: CLARIZIA et al. (2006).

22B

Figuras 22A e 22B: Correlação entre polimorfismos de MTHFR e características clínicas e metilação aberrantes dos genes estudados.

Porém, houve significância estatística entre os polimorfismos de MTHFR e MSI (Figura 23). Esse achado não teve associação com as variações genótípicas estudadas para a ancestralidade.

Table 4. Association between the MTHFR C677T polymorphism and microsatellite instability in colorectal cancer.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	Pp
MSI- (91)	83 (91)	8 (9)	-	-	-
MSI+ (14)	7 (50)	7 (50)	10.4	2.5 - 45.4	0.00057

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

MSI- = no microsatellite instability; MSI+ = microsatellite instability.

Fonte: CLARIZIA et al. (2006).

Figura 23 – Associação entre polimorfismos de MTHFR e MSI em pacientes com CCR.

A proporção de hipermetilação de *MLH1* (principal responsável por MSI em tumores esporádicos) entre os casos de MSI não teve correlação com o genótipo 677TT.

Em 2006, participamos de um estudo multicêntrico (PARK et al. 2006), com a colaboração de 55 membros integrantes da *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors* (INSIGHT). O objetivo era analisar famílias portadoras de SL e diagnóstico de carcinoma de delgado, com mutações identificadas nos principais genes de reparo. Foram incluídos 69 casos, sendo 31 com mutações identificadas em *MLH1*, 34 em *MSH2*, 3 em *MSH6* e 1 em *PMS2*. Colaboramos, nesse estudo, com a inclusão de uma família

com mutação identificada em *MSH2*. O estudo concluiu que o carcinoma de intestino delgado pode ser o primeiro e único câncer em pacientes com SL, com possibilidade de manifestação desde a adolescência. O duodeno e o jejuno são mais freqüentemente afetados, sendo o íleo, mais raramente. Foi encontrada uma correlação genótipo-fenótipo significativa entre a localização das mutações no gene *MSH2*, principalmente entre os códons 626 e 733, e o diagnóstico de carcinoma de intestino delgado (Anexo 11).

Seguindo em nossa linha de pesquisa, algumas hipóteses foram feitas para tentar explicar a freqüência de tumores extracolônicos encontradas no RCCH. Seria uma característica da população brasileira para famílias portadoras de SL? Qual seria a freqüência de mutações germinativas nos genes de reparo em nossa população? Outros genes, ou síndromes, estariam relacionados à alta freqüência encontrada de câncer de mama nessas famílias?

Assim, iniciamos um novo projeto de pesquisa em CCR hereditário, intitulado: “Avaliação da Freqüência de Mutações nos Genes de Reparo *MLH1* e *MSH2* em Famílias com Diagnóstico Suspeito de SL”. O projeto foi enviado e aprovado para financiamento pela FAPESP (2005/05155-6), aprovado pela Comissão de Ética em

Pesquisa institucional e pelo CONEP, por tratar-se de estudo colaborativo internacional.

A justificativa do projeto advinha do fato de a definição molecular da SL, ou HNPCC, estar estabelecida. Por isso, identificar portadores de alterações nos genes *MLH1* e *MSH2* é fundamental para o manejo clínico dessas famílias. A utilização de ensaios de instabilidade de microssatélites e de imunoistoquímica parece ter boa sensibilidade para identificar pacientes candidatos ao seqüenciamento dos principais genes de reparo. Entretanto, esta abordagem foi avaliada, até agora, principalmente, em populações norte-americanas e européias, mas não em pacientes sul-americanos, sobre os quais são encontradas apenas algumas publicações isoladas (SARROCA et al. 2000, 2003, 2005; GIRALDO et al. 2005; VACCARO et al. 2007).

Um dos principais objetivos deste estudo foi avaliar a capacidade dos testes de imunoistoquímica de identificar, dentre os pacientes oriundos de diferentes populações sul-americanas e que preenchessem critérios clínicos para suspeita de SL, portadores de alterações moleculares nos genes *MLH1* ou *MSH2*, determinadas pelo seqüenciamento direto do DNA. A MSI também foi avaliada em alguns casos, por meio de um painel de 10 marcadores: quatro mononucleotídicos (BAT25, BAT26, BAT34c4 e BAT40), cinco

dinucleotídicos (D10S197, D17S250, D18S55, D5S246 e ACTC), e um de composição variável (MYCL), mononucleotídico flanqueado por repetições tetra ou pentanucleotídicas.

Devido às colaborações estabelecidas, até 2005, no Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários (GBETH), houve um grande interesse de alguns grupos de pesquisa sul-americanos em participar de nosso projeto. Inicialmente, as seguintes instituições aceitaram participar em conjunto com o Hospital A.C. Camargo: Hospital Italiano, Buenos Aires, Argentina; Hospital da Universidade Católica, Santiago, Chile; Hospital de Montevideo, Uruguai. Por problemas locais, o grupo do Chile não participou efetivamente do projeto.

Os pacientes foram selecionados a partir dos registros de CCR hereditário das referidas instituições. A previsão foi de um total de 100 probandos, de diferentes famílias.

Foram avaliados 95 pacientes, quanto à imunoistoquímica. Os resultados mostraram que 31,6% dos casos apresentaram uma perda de expressão das proteínas de reparo, denotando uma possível alteração no sistema de reparo do DNA (Tabela 8).

Tabela 8 – Expressão imunoistoquímica das principais proteínas de reparo em 95 casos com suspeita de SL, pelos critérios de Amsterdam ou Bethesda.

Imunoistoquímica	Número	%
Positivos	64	67,4
MLH1/PMS2 negativos	7	7,4
MSH2/MSH6 negativos	15	15,8
MLH1 negativo	1	1,1
PMS2 negativo	6	6,3
MSH6 negativo	1	1,1
Inconclusivo	1	1,1

Diferentemente da literatura, o dímero MSH2/MSH6 apresentou maior frequência de alteração que o dímero MLH1/PMS2. Este achado sugere uma possível variação na população estudada. Por outro lado, pode existir uma sensibilidade mais alta do método para MSH2 (92%), que para MLH1 (48%) (WANG et al. 2007).

Podemos observar, na Figura 24, um exemplo de perda de expressão do heterodímero MLH1/PMS2 e outro em que houve perda do heterodímero MSH2/MSH6.

Legenda: A – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MLH1/PMS2. B – Caso de ausência de expressão para o heterodímero MSH2/MSH6. (-) indica ausência de expressão. (+) indica presença de expressão.

Figura 24 - Fotos exemplificando a expressão imunoistoquímica dos heterodímeros MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6.

Apenas um caso evidenciou ausência de expressão protéica isolada de *MLH1*, achado provavelmente decorrente de hipermetilação do promotor do gene.

Não houve expressão isolada de *PMS2* em 6,3% dos casos, dado condizente com a literatura. Foram identificados, recentemente, quatro rearranjos genômicos em *PMS2*, em um grupo de 112 pacientes suspeitos para SL, sem mutações identificadas em *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*. Mutações em *PMS2* têm sido descritas em pacientes com síndrome de Turcot, possivelmente com um padrão de herança recessivo (HENDRIKS et al. 2006). Outro estudo mostrou que, de 12 tumores MSH-H que mantiveram expressões dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, 8 mostraram perda de expressão de *PMS2* (HALVARSSON et al. 2006).

Podemos ver, na Tabela 9, a correlação entre os resultados da imunoistoquímica e os antecedentes familiares dos indivíduos com CCR. Houve significativa perda de expressão das proteínas de reparo nos tumores de indivíduos que preenchem os critérios de Amsterdam.

Tabela 9 – Correlação dos resultados da imunoistoquímica com os antecedentes familiares de 95 pacientes com suspeita de SL.

Classificação		Sem alteração	Com alteração	Total
Amsterdam I	número	10	18	28
	%	35,7	64,3	29,8
Amsterdam II	número	0	2	2
	%	0	100	2,1
CCF	número	24	4	28
	%	85	14,3	29,8
Bethesda	número	31	6	37
	%	83,8	16,2	38,9
Total	número	65	30	95
	%	68,4	31,6	100

$p < 0,001$ (Teste Qui-quadrado)

CCF = pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam, exceto um deles.

Na Tabela 10, vemos a relação entre a localização do tumor no cólon e os achados de imunoistoquímica em 90 pacientes. Em 5 casos, não foi possível estabelecer a localização do tumor. Houve significativa associação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e tumores proximais no cólon.

Tabela 10 - Correlação entre a localização do tumor no cólon e os resultados da imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Localização Tumor CCR		Sem alteração	Com alteração	Total
Cólon direito	número	12	24	36
	%	33,3	66,7	40
Cólon esquerdo	número	18	2	20
	%	90	10	22,2
Reto	número	31	3	34
	%	91,2	8,8	37,8
Total	número	61	29	90
	%	67,8	32,2	100

$p < 0,001$ (Teste Qui-quadrado)

Podemos observar, na Tabela 11, que também há significativa associação entre a perda de expressão das proteínas de reparo com a presença de mais de um tumor primário, no mesmo indivíduo.

Tabela 11 - Correlação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e a presença de mais de um tumor primário no mesmo indivíduo.

Tumores primários		Sem alteração	Com alteração	Total
1 tumor	número	59	17	76
	%	77,6	22,4	80
2 ou mais tumores	número	6	13	19
	%	31,6	68,4	20
Total	número	65	30	95
	%	68,4	31,6	100

$p < 0,001$ (Teste Qui-quadrado)

Observamos, da Tabela 12, a relação entre o Estádio T e os achados de imunoistoquímica. Os dados apresentados referem-se a 72 pacientes com estadiamento determinado. Houve correlação significativa entre a perda de expressão protéica e os pacientes com tumores classificados como estágio I

Tabela 12 – Correlação entre a perda de expressão das proteínas de reparo e o estadiamento T.

Estadiamento T		Sem alteração	Com alteração	Total
T1	número	1	4	5
	%	20	80	6,9
T2	número	17	7	24
	%	70,8	29,2	33,3
T3	número	24	5	29
	%	82,8	17,5	40,3
T4	número	8	6	14
	%	57,1	42,9	19,4
Total	número	50	22	72
	%	69,4	30,6	100

p = 0,027 (Teste Qui-quadrado)

Não houve correlação significativa entre o estadiamento N ($p=0,083$), o estadiamento M (0,689), e a expressão das proteínas de reparo. Houve correlação significativa entre o subtipo histológico, adenocarcinoma com componente mucinoso, e a perda de expressão das proteínas de reparo (Tabela 13).

Tabela 13 – Correlação entre o subtipo histológico e as alterações encontradas na imunoistoquímica das proteínas de reparo.

Tipo Histológico Adenocarcinoma		Sem alteração	Com alteração	Total
Tubular	número	34	15	49
	%	69,4	30,6	61,2
Componente Mucinoso	número	5	11	16
	%	31,2	68,8	20
Cribriforme	número	6	1	7
	%	85,7	14,3	8,8
Outros	número	8	0	8
	%	100	0	10
Total	número	53	27	80
	%	62,2	33,8	100

p=0,003 (Teste Qui-Quadrado)

Outros = tipo medular ou com células em anel de sinete

Houve correlação significativa entre a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo e o maior número de tumores colorretais e de endométrio nas famílias dos pacientes estudados (Tabela 14).

Tabela 14 – Correlação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo e a número médio de tumores, por localização, nas famílias dos pacientes estudados.

Tumores	Sem alteração	Com alteração	p (Teste T)
Colorretal	2,09	5,22	p < 0,001
Endométrio	0,03	0,33	p = 0,002
Estômago	0,35	0,41	p = 0,824
Hepatobiliar	0,05	0,04	p = 0,815
Intestino Delgado	0,02	0,07	p = 0,167
Pelve Renal/Ureter	0	0	-
Ovário	0,03	0,04	p = 0,910
Pâncreas	0,11	0	p = 0,115
SNC*	0,10	0,11	p = 0,856
Sebáceo	0	0,04	p = 0,130
Mama	0,32	0,11	p = 0,098

* Sistema Nervoso Central

De 26 pacientes analisados, 12 apresentaram MSI em pelo menos um dos marcadores estudados, sendo que os 10 casos com MSI-H (mais de 30% dos marcadores alterados) obtiveram correlação com a falta de expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo (Tabela 15).

Tabela 15 – Número de marcadores de MSI alterados por paciente e sua correlação com a expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo.

	BAT	BAT	BAT	BAT	D10S	D17	D18	D5S			Alteração
N	26	40	25	34c4	197	S20	S5S	346	ACTC	MYCL	IQ
1			X								Ausente
2	X	X									Ausente
3	X	X	X				X	X			MSH2 MSH6
4		X	X	X					X	X	MSH2 MSH6
5			X	X	X	X	X			X	MSH2 MSH6
6	X	X	X	X	X	X		X	X		MSH2 MSH6
7	X	X	X	X	X			X	X	X	MLH1 PMS2
8	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MSH2 MSH6
9	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MLH1 PMS2
10	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MSH2 MSH6
11	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	MLH1
12	?	X	?				X	X		X	MSH2 MSH6

IQ - imunoistoquímica.

O fenótipo MSI-H é encontrado entre 85% e 92% dos casos de CCR associados à SL. A MSI está correlacionada a deficiências no sistema de reparo em 93% dos casos (HENDRIKS et al. 2006; WANG et al. 2007).

Aproximadamente 95% dos casos com MSI-H estão ligados com a perda de expressão de MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2, enquanto que os 5% restantes devem-se a outras etiologias (BAUDHUIN et al. 2005).

Dos 12 casos que apresentaram MSI, todos os classificados como MSI-H apresentaram alteração na expressão imunoistoquímica de pelo menos uma proteína de reparo. Sete casos apresentaram perda de expressão de MSH2 e MSH6, dois de MLH1 e PMS2, e um de MLH1. A pesquisa de hipermetilação do promotor de *MLH1* deve ser realizada neste último caso.

Para a pesquisa de mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2*, foram incluídos 122 indivíduos portadores de CCR, com critérios de risco preenchidos para hereditariedade, como podemos ver na Tabela 16.

Tabela 16 – Descrição do número de famílias estudadas, com relação aos genes *MSH2* e *MLH1*, de acordo com critérios de risco de hereditariedade.

Critérios - antecedentes familiares	N	%
Amsterdam I	51	41,8
Amsterdam II	8	6,6
Câncer Colorretal Familiar	24	19,7
Bethesda	39	32
Total	122	100

Na Tabela 17, abaixo, podemos observar a relação entre o tipo de mutação encontrada e o critério de risco de hereditariedade utilizado, resultado preliminar do estudo. Notamos que quase metade das alterações foi encontrada em pacientes pertencentes a famílias classificadas dentro dos critérios de Amsterdam, que são específicos e restritivos. Por outro lado, os indivíduos classificados de acordo com critérios menos restritivos, e, conseqüentemente, mais sensíveis, apresentaram a outra metade das mutações detectadas nos genes de reparo estudados. Esses dados sugerem que somente a utilização de critérios restritivos, tais como os critérios de Amsterdam, para rastrear mutações nos genes de reparo *MLH1* e *MSH2*, em famílias com suspeita de diagnóstico de SL, pode ser insuficiente. Critérios menos restritivos podem aumentar a sensibilidade do rastreamento.

Atualmente, estamos analisando o valor da expressão imunoistoquímica das proteínas de reparo, enquanto exame de

rastreamento na detecção de mutações nos respectivos genes de reparo.

Tabela 17 – Mutações encontradas no genes *MLH1* e *MSH2*, de acordo com o critério de risco de hereditariedade.

Tipo de mutação		Critérios de risco de hereditariedade				Total
		Amsterdam I	Amsterdam II	CCF	Bethesda	
<i>missense</i>	N	9	2	2	6	19
	%	47,4	10,5	10,5	31,6	
<i>nonsense</i>	N	0	0	0	1	1
	%	0	0	0	100	
<i>frameshift</i>	N	5	1	5	5	16
	%	31,2	6,2	31,2	31,2	
<i>Splicing site</i>	N	2	0	0	1	3
	%	66,7	0	0	33,3	
Total	N	16	3	7	13	39
	%	41,0	7,7	17,9	33,3	100

Amsterdam I – Critérios de Amsterdam I;
 Amesterdam II – Critérios de Amsterdam II;
 CCF - Câncer Colorretal Familiar;
 Bethesda - Critérios Bethesda.

Recentemente, publicamos a descrição de duas mutações no gene *MLH1*, ainda não descritas na literatura, detectadas em dois indivíduos avaliados no estudo, pertencentes a famílias com critérios de Amsterdam (DOMINGUEZ et al. 2008) (Anexo 12).

Com os resultados alcançados com o referido projeto, outras questões permaneciam em aberto.

Cerca de um terço das famílias que preenchem os critérios clínicos de Amsterdam para SL não apresentam evidências de defeitos no Sistema de Reparo do DNA. LINDOR et al. (2002), avaliando famílias americanas, australianas e européias, demonstraram que aquelas que preenchiam os Critérios de Amsterdam, e não possuíam alterações moleculares detectáveis no sistema de reparo, apresentavam padrão de incidência de tumores e idade de acometimento, diferentes das famílias nas quais as alterações podiam ser caracterizadas. Estes resultados têm uma implicação prática direta na orientação das famílias, na conduta terapêutica, e no seguimento a ser estabelecido.

Outra questão referia-se ao motivo de o câncer de mama ser o tumor extracolônico mais freqüente em mulheres com suspeita de CCR hereditário em nosso RCCH. Na literatura, ele não faz parte dos critérios de Amsterdam, ou sequer está relacionado como integrante da síndrome de Lynch.

MEIJERS-HEIJBOER et al. (2003) sugerem a possibilidade de uma nova síndrome de predisposição hereditária ao câncer de mama e de cólon, associada ao gene *CHEK2*. Essa publicação abre mais um horizonte na busca da resposta à nossa pergunta. Mas, ainda assim, seria a associação de câncer de mama e CCR uma característica de famílias brasileiras? Estaríamos diante de alterações em *CHEK2*, ou em outros genes?

Com relação aos pacientes de alto risco hereditário para CCR, não foram encontrados estudos nacionais para avaliar como surgem as lesões precursoras. Haveria alguma alteração molecular prévia ao aparecimento da lesão macroscópica na mucosa colônica? Qual seria o limite visual para a caracterização endoscópica desta lesão nos pacientes sob risco?

Além disso, enfrentávamos dificuldades com o RCCH, pois com o aumento exponencial do número de famílias, e, conseqüentemente, do número de indivíduos, aumentava também o trabalho e a dificuldade em organizar o banco de dados. A busca de indivíduos era realizada de forma manual, apesar do uso de programas de computador para o registro das famílias. Com a inclusão de pacientes de outras instituições, outros problemas tornaram-se evidentes na avaliação dos dados, como, por exemplo, a falta de padronização das informações, e o uso de diferentes programas para o registro.

Diante disso, elaboramos um projeto multidisciplinar que pudesse contemplar as perguntas e as dificuldades enfrentadas. O projeto denomina-se “Predisposição Hereditária ao Câncer Colorretal e ao Câncer de Mama: Manejo de Pacientes de Alto Risco e suas Famílias”. Enviamos a proposta ao CNPq, que aprovou o

financiamento do projeto em 2006, que também aprovado pela Comissão de Ética institucional.

Esse amplo projeto, além de contemplar aspectos moleculares de famílias com suposta predisposição hereditária ao câncer, sem mutação causal identificada, também aborda a reestruturação e a ampliação do RCCH, com o desenvolvimento de um sistema computacional para o registro e gerenciamento de dados.

Com relação ao RCCH, as soluções atualmente empregadas para o seu gerenciamento incluem a organização de dados em formato não-digital (fichas e formulários em papel) e a utilização de *softwares* proprietários com recursos limitados. O volume de dados acumulado e a dificuldade de gerenciá-los de forma eficiente evidenciaram a necessidade de criação de um sistema de registro especificamente desenvolvido em função das necessidades particulares do RCCH. Este sistema deveria estar baseado em conceitos e linguagem padronizados, e também ser desenvolvido e implementado por uma equipe multidisciplinar. A utilização de *softwares* proprietários é indesejável para a implantação de uma base de dados destinada a armazenar e gerenciar dados em longo prazo, uma vez que tais *softwares* podem não permitir a expansão da base de dados ou sua migração para novas tecnologias da Área de informação.

A expansão da INTERNET, a disponibilidade de sistemas operacionais e *softwares* estáveis de código aberto, e a consolidação de protocolos seguros para o tráfego e armazenamento de dados viabilizam o desenvolvimento de um Sistema de Registro e Gerenciamento de Dados de Câncer Hereditário acessível via INTERNET, por meio de interface *WEB*. A implementação deste conceito de registro pode fornecer ferramentas que viabilizem o gerenciamento eficiente de dados de câncer hereditário, não apenas em termos locais, como também em Instituições credenciadas pelo Sistema Único de Saúde, que atuem ou que desejam implantar serviços na Área. Em contrapartida, por meio da utilização de um Sistema de Registro acessível via INTERNET, as Instituições estariam contribuindo para a formação de uma ampla base de dados, capaz de fornecer um panorama sobre o CCR hereditário no país. Essa base de dados poderia, portanto, auxiliar na obtenção de dados epidemiológicos e no planejamento e avaliação do impacto de políticas de saúde pública que tenham como alvo famílias com alto risco para o desenvolvimento de câncer.

Assim, desenvolver um sistema para o registro e gerenciamento de dados relacionados ao câncer hereditário é de suma importância. Este sistema deverá ter como principais características:

- ✓ Ser acessível via INTERNET, por meio de interface *WEB*, facilitando sua utilização, uma vez que minimiza os custos de

implantação de sistemas proprietários de gerenciamento de dados em diferentes Instituições;

- ✓ Proporcionar integridade, segurança e sigilo dos dados armazenados: o sistema deverá prever a confidencialidade e a privacidade das informações relacionadas a cada Departamento e/ou Instituição, além de possibilitar a análise conjunta da base de dados padronizada, preservando o sigilo das informações de pacientes e familiares;
- ✓ Padronizar a utilização de códigos e vocabulário de acordo com padrões definidos internacionalmente;
- ✓ Criar uma *interface* para o usuário final, entre o serviço de registro e o de aconselhamento oncogenético;
- ✓ Utilizar tecnologias de código aberto, uma vez que o desenvolvimento do Sistema será baseado em tecnologias de ampla utilização no contexto mundial e que permitam a atualização, expansão ou migração do sistema (*hardware* e *software*), com o objetivo de acompanhar as tendências e inovações na Área de Tecnologia da Informação.

Toda a implementação do sistema será realizada utilizando um sistema operacional e *softwares* livres, ou “*freewares*”. Como Sistema Operacional, será utilizado o Linux, distribuição Fedora, banco de dados relacional MySQL, servidor de serviços WEB Apache, e linguagem de programação PHP, para implementar a interface WEB e integrá-la à base de dados. Programas adicionais para a análise da

base de dados serão implementados em linguagem Perl, C++ ou utilizando o Pacote estatístico R. Estas opções apóiam-se em critérios técnicos com base na experiência adquirida na rotina de desenvolvimento de sistemas do Laboratório de Bioinformática do Hospital A.C.Camargo (LBHC). São tecnologias bastante utilizadas, e, constantemente, aperfeiçoadas e testadas pela comunidade científica mundial.

A confidencialidade, integridade e disponibilidade da informação estão diretamente ligadas com a segurança. O LBHC já possui implementações de acordo com as diretrizes e princípios da NBRISO/IEC17799, para garantir maior segurança dos dados armazenados, bem como fornecer segurança para o usuário final, ou seja, servidores de armazenamento contendo informações de acessos restritos isolados do ambiente de Internet, tráfego de informação pela Internet, utilizando criptografia baseadas em chave pública e privada de 128bits, e restrições com níveis de acesso, tanto para os usuários como para a equipe encarregada do desenvolvimento e manutenção do Sistema.

Neste Sistema, cada indivíduo cadastrado estará relacionado a uma família e, dentro de uma mesma família, cada indivíduo estará relacionado a outro(s) indivíduo(s) por meio de relações biológicas ou sociais. Cada família será relacionada ao seu próprio Departamento e à Instituição responsável por seu atendimento. Apenas usuários pertencentes a um dado Departamento específico, e que tenham

determinada permissão, poderão realizar cadastramentos e atualizações de dados. Esta estrutura de dados possibilitará que Instituições e Departamentos distintos tenham acesso apenas à sua própria base de dados.

Atualmente, mais de 70 famílias do RCCH do Hospital A.C.Camargo já foram transferidas para o *Oncotree Database*, nome dado ao novo Sistema de registro. Nas figuras a seguir (Figuras 25A a 25H), podemos observar como está sendo realizada a visualização das telas de acesso para construção e edição de famílias, as fichas de identificação e de dados, além do tutorial.

Familymanager

LOGIN

Usuario:

Senha:

[Perdi minha senha](#) | [Solicita acesso ao sistema](#)

lab@lbhc.hcancer.org.br

Figura 25A – Tela de acesso ao Sistema de dados, com identificação e senha.

SISTEMA EM FASE DE DESENVOLVIMENTO (PROTOTIPO)

Figura 25B – Tela de identificação do programa, que está em fase final de desenvolvimento.

Figura 25C – Tela de construção e edição de famílias.

Figura 25D – Exemplo de heredograma produzido pelo programa.

The screenshot shows the 'OncoTree Database' web application. At the top, there is a header with the title 'OncoTree Database' and a tree icon. To the right of the header are links for 'Meus Dados', 'Help?', and 'Logout'. Below the header is a navigation bar with 'Iniciar' and 'Editar' buttons. The main content area is divided into three sections:

- Documentos:** Contains input fields for 'RG', 'CPF', and 'RGH'.
- Fichas disponiveis:** A table listing available data sheets with a 'Listar' button for each row.

Modelo	
Ficha Geral	Listar
Ficha unificada colorretal (parte 1)	Listar
Ficha unificada colorretal (parte 2)	Listar
Ficha unificada colorretal (parte 3)	Listar
- Legenda:** A legend box on the right side containing:
 - Ficha Preenchida (light blue square)
 - Ficha NAO Preenchida (light red square)
 - Visualizar Ficha (magnifying glass icon)
 - Editar Ficha (pencil icon)
 - Deletar Inf. da Ficha (trash can icon)

At the bottom of the 'Documentos' section are 'Adicionar' and 'Voltar' buttons.

Figura 25E – Tela de identificação de indivíduos para acesso às fichas de dados.

Ficha Geral

Nome do usuario responsavel pelo preenchimento sem informacao
 Usuario sem informacao
 Atualizada em sem informacao
 Fonte de Informacao sem informacao

Informacoes Gerais do Paciente

Prontuário

Nome

Escolaridade Ensino Fundamental ☐ Analfabeto ☐ Primeiro Grau Incompleto ☐ Primeiro Grau Completo ☐
 Segundo Grau ☐ Ignorado ☐

Endereco

Telefone

Telefone 2

Figura 25F – Tela com ficha de dados gerais do paciente.

Registro de Câncer Colorretal hereditário - Resumo Individual I v2

Nome do usuário responsável pelo preenchimento sem informacao
 Usuário sem informacao
 Atualizada em sem informacao
 Fonte de Informacao sem informacao

Resumo Individual I

Acesso ao indivíduo Sim ☐ Não ☐ Ignorado ☐

Investigado? Não, fora da faixa etária ☐ Não investigado ☐ Investigado ☐ Ignorado ☐

Afetado? Sim ☐ Não ☐ Ignorado ☐

Resultado do teste genético Não realizado na família ☐ Não realizado no indivíduo ☐ Inconclusivo ☐ Negativo ☐ Positivo ☐ Ignorado ☐

Classificação história familiar

Figura 25G – Tela com ficha de dados contendo características do paciente.

LBHC - Laboratorio de Bioinformática

OncoTree: Tutorial - LBHCwiki

Log in / create account

article discussion edit history

OncoTree: Tutorial

Contents [hide]

- 1 Como acessar o OncoTree?
- 2 Como cadastrar uma nova Família?
- 3 Como abrir uma Família para edição?
- 4 Como editar uma família?
 - 4.1 O que significam as listas "Indivíduos Conectados" e "Indivíduos Não Conectados"?
 - 4.2 Adicionando novos indivíduos
 - 4.2.1 Adicionando pais
 - 4.2.2 Adicionando filhos biológicos
 - 4.3 Irmãos gêmeos
 - 4.3.1 Como cadastrar os irmãos gêmeos?
 - 4.4 Adoções
 - 4.4.1 Adicionando filhos adotivos através da opção "Adicionar Filhos Adotivos"
 - 4.4.2 Gerenciando adoções através da opção "Gerenciar adoções"
 - 4.5 Modificando e corrigindo as relações familiares.
 - 4.5.1 Apagar relações: Indivíduo
 - 4.5.2 Apagar relações: Descendentes
 - 4.5.3 Apagar relações: Todas as Relações
 - 4.6 Realizando buscas de relações familiares
 - 4.7 Visualizando o heredograma da família
 - 4.7.1 Entenda o heredograma

navigation

- LBHC
- Current events
- Recent changes
- Random page
- Help
- Donations

search

Go Search

toolbox

- What links here
- Related changes
- Upload file
- Special pages
- Printable version
- Permanent link

Figura 25H – Tela com orientações para acesso ao tutorial.

Com relação à caracterização molecular das síndromes hereditárias de predisposição ao CCR, o projeto prevê que os pacientes com diagnóstico clínico de SL, e com teste negativo para *MLH1* e *MSH2*, devam ser submetidos ao seqüenciamento dos genes *hMSH6* e *PMS2*. Atualmente, temos cerca de 50 casos nessa condição.

Os pacientes que não tiverem alterações identificadas nos genes *hMSH6* e *PMS2* serão estudados para mutações nos genes *CHEK2* e *TP53*.

Para pacientes com associação, familiar ou individual, de câncer de mama e de cólon, será avaliada a presença de mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2*. Atualmente, temos DNA extraído de cerca de 90 pacientes, e esperamos cerca de 60% de exames sem alterações detectadas naqueles genes. Nesses casos, será realizado, também, o seqüenciamento dos genes *CHEK2* e *TP53*. O fluxograma abaixo resume o desenho do projeto (Figura 26).

Figura 26 – Fluxograma resumindo os objetivos dos projetos de pesquisa sobre possíveis causas de predisposição ao CCR hereditário.

Quanto ao rastreamento de lesões precursoras e precoces em pacientes considerados de alto risco para CCR, será utilizada a colonoscopia com os recursos de magnificação de imagem e cromoscopia. A maior parte dos estudos traça o perfil molecular das principais síndromes de predisposição hereditária ao câncer em populações da Europa e da América do Norte. Não há ainda um perfil molecular das mutações associadas aos principais genes envolvidos na predisposição ao câncer hereditário na população brasileira. A determinação de possíveis correlações genótipo/fenótipo específicas pode possibilitar o delineamento de estratégias de rastreamento e de

manejo de pacientes brasileiros e suas famílias. No caso da SL, por exemplo, não foram encontrados estudos de diagnóstico e acompanhamento de lesões precursoras planas do epitélio colônico que correlacionem achados anatomopatológicos e moleculares. O diagnóstico destas lesões é difícil e exige colonoscopistas experientes, além de equipamentos especiais, dotados com recursos de magnificação de imagem.

Ainda dentro da linha de pesquisa sobre lesões precursoras, elaboramos um outro projeto, que foi aprovado este ano pela FAPESP (2008/01605-5), também aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa institucional, e que é coordenado pelo Dr. Fabio Ferreira. É complementar ao braço do Projeto do CNPq, que financiou o aparelho de colonoscopia com magnificação de imagem e *Narrow Band Imaging* (NBI). Esse projeto é denominado “Caracterização da Mucosa do Cólon e de Lesões Precursoras, em Pacientes de Alto Risco para Câncer Colorretal”.

A colonoscopia é o melhor método de rastreamento para pacientes com alto risco para CCR. É útil não apenas para o diagnóstico de lesões precursoras e precoces, mas também para o tratamento de tais lesões. Possui elevada sensibilidade e especificidade, permitindo também a execução de biópsias para estudos de patologia e de biologia molecular. A colonoscopia com NBI

e magnificação de imagem aumenta a sensibilidade e a especificidade do exame convencional. Portanto, esses recursos adicionais da colonoscopia podem trazer um impacto positivo no estudo de pacientes de alto risco.

Assim, este projeto, ao utilizar essa metodologia, tem por objetivo verificar a frequência e a caracterização de lesões precursoras em pacientes de alto risco para CCR, correlacionando-as com características clínicas, moleculares e anatomopatológicas. Além disso, visa também caracterizar alterações moleculares pré-clínicas em mucosa aparentemente normal nos mesmos pacientes, registrados no RCCH, com suspeita de síndrome de Lynch, pelos critérios de Bethesda ou de Amsterdam. Os pacientes-controle serão aqueles maiores de 50 anos, sem antecedentes familiares, submetidos à colonoscopia de rastreamento para CCR.

Na realização do exame, todas as lesões encontradas, quando possível, deverão ser ressecadas. Também deverão ser obtidas biópsias de tecido colônico macroscopicamente normal. Neste material, serão realizados: exame anatomopatológico, imunoistoquímica das proteínas MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, COX-2, β -catenina e p53, avaliação do perfil de mutação dos genes *K-ras* e *BRAF*, e avaliação do *status* de metilação do gene *MLH1*.

Este projeto está em pleno andamento, com cada uma das metas dentro do cronograma estabelecido, para término ao início de 2009.

Atualmente, participo ainda de outros dois projetos, recentemente aprovados para financiamento pela FAPESP, e também pela Comissão de Ética institucional, e coordenados pela Dra. Renata Coudry. O primeiro deles, sob número 2007/01828, é denominado “Estudo da Via de Sinalização Wnt em Câncer Colorretal, através da análise de proteínas, mRNAs e microRNAs”. A via de sinalização Wnt está relacionada à diferenciação de células epiteliais do cólon, e tem fundamental participação na carcinogênese colorretal. Tal via está alterada em cerca de 80% das neoplasias colorretais esporádicas (POWELL et al. 1992), e está relacionada com a diferenciação de células epiteliais do cólon.

Alguns componentes da via são descritos como importantes nesse processo: receptores de Wnts, proteínas do complexo β -catenina/APC, fatores de transcrição, e proteínas-alvo. As proteínas Wnt são sinalizadoras. Em resposta ao sinal Wnt, os receptores *frizzled* ativam a fosfoproteína quinase *disheveled*, que inibe a atividade da *glycogen synthase kinase 3 β* (GSK-3 β). Essa inibição leva ao acúmulo de β -catenina hipofosforilada no citoplasma e à redistribuição da β -catenina no núcleo. O processo libera a molécula

β -catenina do chamado complexo de destruição, o qual, na ausência de Wnts, promove a degradação da via ubiquitinação-proteossoma (NELSON e NUSSE 2004).

Subseqüentemente, a β -catenina livre dirige-se para o núcleo da célula e associa-se a fatores que se ligam ao DNA para promover a transcrição de genes fundamentais na proliferação celular. Essa fosforilação pela GSK é catalisada por um grande complexo molecular, que inclui a proteína axina, a supressora tumoral APC e várias outras proteínas. Quando ocorre uma mutação no gene APC ou em qualquer outro gene membro do complexo de degradação da β -catenina, esta desencadeia a formação de uma proteína constitutivamente ativa. E-caderina, β -catenina e o produto do gene APC são elementos desta via e estão envolvidos na carcinogênese do trato gastrointestinal. E-caderina e APC funcionam como produtos de genes supressores de tumor, e β -catenina como produto de oncogene.

A via E-caderina também apresenta alterações, passando a expressar maior quantidade de collagenases, enzimas que degradam a matriz extra-celular, especificamente os colágenos. Aparentemente, alterações em APC não são suficientes para gerar um fenótipo invasivo, assim, provavelmente, há outras vias dependentes de E-caderina alteradas ao longo da progressão do CCR. Mutações em APC e β -catenina resultam na ativação permanente dos genes-alvo da via Wnt. Alguns autores demonstram a detecção de β -catenina nuclear e

citoplasmática em diferentes tipos de câncer (LOPEZ-GONZALEZ et al. 2004). O domínio amino-terminal da β -catenina contém 4 seqüências para fosforilação pela GSK-3b, com mutações descritas em CCR com APC normal (AKIYAMA 2000). Mutações no gene *APC* ou em *β -catenina* podem resultar no acúmulo do complexo β -catenina no citoplasma e no núcleo, causando atividade transcricional aumentada, com efeitos na ciclina D1 e em c-myc (LEE et al. 2003).

Na ausência de sinalização Wnt, β -catenina liga-se ao complexo APC/Axin/GSK3 β , sendo fosforilada e seguindo para degradação via ubiquitinação/proteossomo. Na presença de sinalização por Wnt ou devido a uma mutação em um dos genes que codificam as moléculas do complexo descrito acima, a β -catenina está liberada e segue para o núcleo, promovendo a transcrição de fatores associados à proliferação celular [Figura 27-cedida pelo Dr. Jacques Coudry (CLAPPER et al. 2004)]

Figura 27 – Desenho esquemático da via Wnt.

Micro-RNAs (miRNAs) representam uma nova classe de RNAs endógenos, com aproximadamente 22 nucleotídeos, que atuam como silenciadores pós-transcricionais, inibindo a tradução de RNAs mensageiros-alvo. Descobertos há pouco mais de uma década em *Caenorhabditis elegans*, são hoje reconhecidos como reguladores fundamentais da expressão gênica. Até o momento, 462 miRNAs diferentes foram identificados em humanos, estimando-se que esse número supere 1.000 miRNAs, que exercem seus efeitos inibitórios ao ligar-se à região 3'UTR, não-traduzida de RNAs mensageiros específicos (RNAm-alvo). Os miRNAs estão associados à regulação de

proliferação, apoptose, diferenciação, hematopoese, entre outras funções (FALUS, e MOLNÁR 2008; DIDIANO e HOBERT 2008).

Não foram encontrados estudos de correlação entre alterações na via Wnt e recorrência à distância em pacientes operados por CCR. Por isso, o objetivo é avaliar os integrantes da via Wnt (família das proteínas Wnt, receptores de Wnt, proteínas do complexo β -catenina/APC, fatores de transcrição e proteínas-alvo) em pacientes portadores de CCR, estádios I, II ou III, submetidos ao tratamento curativo. Será feita a correlação entre os casos com recorrência à distância e aqueles sem atividade de neoplasia.

Os genes *SFRP1*, *FZ1*, *WNT1*, *DISHEVELLED*, *APC*, *AXIN*, *GSK3 β* , *β -CATENINA*, *TCF4*, *CICLINA-D1*, *C-MYC*, *COX-2* serão estudados pela técnica de RT-PCR, assim como o painel de micro-RNAs, que será adquirido comercialmente. Os resultados serão analisados em relação ao tecido normal do cólon e ao CCR.

A expressão das seguintes proteínas será avaliada pela técnica de imunoistoquímica: *β -catenina*; *SFRP1* a 5; *Wnt 1* a 5; *Frizzled*; *Dishevelled*; *APC*; *Axin*; *GSK3 β* ; *LRP5* e 6; *TCF4*; *Ciclina D1*; *CD44*; *C-Myc*; *MMP7*; *Cox2*; *Kaiso*; *MITF* e *P120*.

O segundo projeto do qual participo, sob número 2008/01240-7, FAPESP, também coordenado pela Dra. Renata Coudry, é

denominado “Avaliação da Sintase do Óxido Nítrico, Nitrato e Nitrito e suas Correlações com Alterações Moleculares de *O*⁶-*Methylguanine-DNA Methyltransferase* em Câncer Colorretal”.

Esse estudo tem como cerne a avaliação de substâncias contidas na dieta ocidentalizada, caracterizada pelo alto consumo de carnes vermelhas e baixo consumo de frutas, considerados fatores de risco para CCR. Indivíduos com alta ingestão de carne vermelha ou processada têm um risco elevado de desenvolver CCR. A carne é uma fonte considerável de agentes mutagênicos, incluindo os compostos nitrosos, as aminas heterocíclicas e os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos. Agentes alquilantes, tais como os compostos nitrosos, podem modificar a estrutura do DNA celular e induzir a mutações ou câncer. Entre os adutos gerados por estes compostos, o *O*⁶ methylguanine é um dos que apresentam maior potencial de induzir o câncer. Para prevenir os danos causados por estes compostos, os organismos vivos apresentam enzimas específicas que reparam o DNA, como, por exemplo, a *O*⁶-*Methylguanine-DNA Methyltransferase* (MGMT ou AGT). Esta proteína tem como função transferir tanto os grupos *O*⁶-methylguanine como os grupos *O*⁴-methylthymine adicionados ao DNA, reparando o DNA alquilado (KNEKT et al. 1999; SZALECZKY et al. 2000; CIANCHI et al. 2004; SANTARELLI et al. 2008; SØRENSEN et al. 2008; SUEHIRO et al. 2008).

O óxido nítrico (NO), uma importante molécula de sinalização, é um gás incolor com curto tempo de vida, sintetizado a partir da L-arginina, por várias enzimas chamadas de sintases do óxido nítrico. Dietas ricas em carne vermelha, um dos principais fatores de risco para CCR, aumentam a oxidação de NO pelas NOS devido à maior quantidade de L-arginina. O NO, por ter uma vida muito curta, necessita, logo após sua produção, tornar-se estável, e, para isto, reage com um ou mais elementos ou com compostos biológicos. Uma forma de estabilidade é sua interação com o oxigênio e a formação de nitritos e nitratos, os quais são medidos no soro, na urina ou na saliva. Clinicamente, os nitratos e nitritos refletem o *status* de um paciente quanto à sua produção de NO. Altas concentrações de nitrato e nitrito sugerem que grandes quantidades de NO foram produzidas. Altos níveis de NO e compostos nitrosos causam a inativação da proteína de reparo MGMT, que atua no processo de reparo do DNA, removendo radicais alquila do oxigênio da posição 6 (O⁶) das guaninas. A adição de radicais alquila ao O⁶ da guanina é uma importante fonte de mutações.

Outro mecanismo que leva à perda de MGMT é decorrente da hipermetilação de ilhas CpG, na região promotora do gene. Apesar da intrínseca correlação encontrada entre NO e seus derivados e a proteína MGMT, há poucos estudos que correlacionam essas moléculas e CCR (ALIEV et al. 2002; NAGASAKA et al. 2008; CAI et al. 2008).

Assim, o objetivo deste estudo é analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas NOS (NOS1, NOS2, NOS3) e os níveis de nitrato e nitrito no sangue, comparando com a expressão imunoistoquímica da proteína MGMT e o *status* de metilação do gene MGMT. Dados clínicos, incluindo o Índice de Massa Corporal (IMC), e anatomopatológicos, serão também avaliados.

Com o aumento do número de projetos aprovados e de alunos de iniciação científica/PIBIC, mestrado e doutorado, organizei o Grupo de Pesquisas em Câncer Colorretal (GPCCR), atualmente registrado no CNPq. Coordeno as reuniões semanais do novo GPCCR, que são realizadas desde o início de 2007, com a participação dos orientadores de projetos relacionados ao CCR, e seus respectivos alunos. O objetivo dessas reuniões é organizar e desenvolver de forma coordenada os projetos de pesquisa em andamento, facilitando, assim, o trabalho dos orientadores e a produção dos orientandos. Tem sido muito proveitoso para todos, pois tem havido uma rica troca de conhecimento, com profundo conteúdo, além de tornar mais fluido o desenvolvimento dos projetos e mais ágil a manutenção dos cronogramas de trabalho.

Antevejo, com muito otimismo, as perspectivas futuras do GPCCR, considerando vários aspectos, entre eles, a união do grupo e o alinhamento de idéias e dos projetos de pesquisa. Espero continuar, em conjunto com os pesquisadores do grupo, a contribuir com o estudo do CCR com predisposição hereditária no Brasil.

Conclusão

A expansão dos conhecimentos genéticos e moleculares sobre os tumores com predisposição hereditária ocorreu após a década de 1990, principalmente na Europa e nos Estados Unidos. No Brasil, os estudos genético-moleculares ainda não são conclusivos no que diz respeito a uma correlação genótipo-fenótipo. Também não são encontrados dados clínicos consistentes, provenientes de registros, oriundos de famílias com suspeita de predisposição hereditária ao câncer. Por isso, não temos informações, em nosso país, sobre a real incidência das síndromes hereditárias relacionadas ao câncer colorretal ou de agregações familiares ainda não-determinadas.

Esforços devem ser concentrados no estudo dos tumores com predisposição hereditária. Por isso, desde 1992, com a criação do Registro de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C.Camargo, que propiciou a organização de um banco de dados estruturado, temos participado de estudos voltados para a polipose adenomatosa familiar e para a síndrome de Lynch, ambas síndromes típicas, bem definidas molecularmente. O Grupo Brasileiro de Estudos de Tumores Hereditários, criado em 2003, tem contribuído para a disseminação de informações sobre o assunto, por meio de publicações e do *site* www.geth.org.br.

Mais recentemente, temos participado de projetos de pesquisa voltados para o estudo de famílias com síndromes não-típicas de predisposição ao câncer colorretal, síndromes estas ainda pouco estudadas. Tais pesquisas incluem a busca de novas alterações genéticas, além de associações com outros tumores primários, entre eles, o câncer de mama.

O desenvolvimento de um registro eletrônico de famílias, em plataforma *Web*, acessível a Instituições de pesquisa, pode contribuir de forma fundamental para facilitar a criação de novos registros em diferentes partes do país, passo básico para novos estudos colaborativos na Área.

O conhecimento adquirido, até o momento, ainda é muito escasso e pontual, se levarmos em conta a dimensão das possibilidades da pesquisa em tumores com predisposição hereditária no Brasil. Devemos avaliar nossos estudos como um primeiro passo para a continuidade de uma linha de pesquisa promissora, com possibilidade de reverter os investimentos realizados pelas agências de fomento em benefícios de ordem prática para a população.

Referências

- Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nyström-Lahti M, Järvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995;64(6):430-3.
- Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, Salovaara R, Aaltonen LA, de la Chapelle A, Peltomäki P, Mecklin JP, Järvinen HJ. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *Int J Cancer* 1999;81(2):214-8.
- Achatz MI, Olivier M, Le Calvez F, Martel-Planche G, Lopes A, Rossi BM, Ashton-Prolla P, Giugliani R, Palmero EI, Vargas FR, Da Rocha JC, Vettore AL, Hainaut P. The TP53 mutation, R337H, is associated with Li-Fraumeni and Li-Fraumeni-like syndromes in Brazilian families. *Cancer Lett* 2007;245(1-2):96-102.
- Akiyama T. Wnt/beta-catenin signaling. *Cytokine Growth Factor Rev* 2000;11(4):273-82.
- Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, Roberts KR, Walter P. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre: Artmed; 1999. Seqüências repetitivas de DNA e elementos transponíveis.
- Aliev G, Smith MA, Seyidova D, Neal ML, Shi J, Loizidou M, Turmaine M, Friedland RP, Taylor I, Burnstock G, Perry G, Lamanna JC. Increased expression of NOS and ET-1 immunoreactivity in human colorectal metastatic liver tumours is associated with selective depression of constitutive NOS immunoreactivity in vessel endothelium. *J Submicrosc Cytol Pathol* 2002;34(1):37-50.

Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJ, Pena SD. Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? *Neoplasia* 2005a;7(4):331-5.

Anacleto C, Rossi B, Lopes A, Soares FA, Rocha JC, Caballero O, Camargo AA, Simpson AJ, Pena SD. Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. *Oncol Rep* 2005b;13(2):325-8.

Avezzù A, Agostini M, Pucciarelli S, Lise M, Urso ED, Mammi I, Maretto I, Enzo MV, Pastrello C, Lise M, Nitti D, Viel A. The role of MYH gene in genetic predisposition to colorectal cancer: Another piece of the puzzle. *Cancer Lett* 2008;268(2):308-13.

Bartman AE, Sanderson SJ, Ewing SL, Niehans GA, Wiehr CL, Evans MK, Ho SB. Aberrant expression of MUC5AC and MUC6 gastric mucin genes in colorectal polyps. *Int J Cancer* 1999;80(2):210-8.

Baudhuin LM, Burgart LJ, Leontovich O, Thibodeau SN. Use of microsatellite instability and immunohistochemistry testing for the identification of individuals at risk for Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005;4(3):255-65.

Benatti P, Sassatelli R, Roncucci L, Pedroni M, Fante R, Di Gregorio C, Losi L, Gelmini R, Ponz de Leon M. Tumour spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and in families with "suspected HNPCC". A population-based study in northern Italy. Colorectal Cancer Study Group. *Int J Cancer* 1993;54(3):371-7.

Birch JM, Alston RD, McNally RJ, Evans DG, Kelsey AM, Harris M, Eden OB, Varley JM. Relative frequency and morphology of cancers in carriers of germline TP53 mutations. *Oncogene* 2001;20(34):4621-8.

Bisgaard ML, Bülow S. Familial adenomatous polyposis (FAP): genotype correlation to FAP phenotype with osteomas and sebaceous cysts. *Am J Med Genet A* 2006;140(3):200-4.

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.

Boland CR. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. *Fam Cancer* 2005;4(3):211-8.

Boman BM, Walters R, Fields JZ, Kovatich AJ, Zhang T, Isenberg GA, Goldstein SD, Palazzo JP. Colonic crypt changes during adenoma development in familial adenomatous polyposis: immunohistochemical evidence for expansion of the crypt base cell population. *Am J Pathol* 2004;165(5):1489-98.

Buisine MP, Janin A, Maunoury V, Audié JP, Delescaut MP, Copin MC, Colombel JF, Degand P, Aubert JP, Porchet N. Aberrant expression of a human mucin gene (MUC5AC) in rectosigmoid villous adenoma. *Gastroenterology* 1996;110(1):84-91.

Bülow S, Berk T, Neale K. The history of familial adenomatous polyposis. *Fam Cancer* 2006;5(3):213-20.

Burke CA. Polipose juvenil. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. *Câncer de cólon, reto e ânus*. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.631-636.

Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004;23(1-2):77-99.

Cai G, Xu Y, Lu H, Shi Y, Lian P, Peng J, Du X, Zhou X, Guan Z, Shi D, Cai S. Clinicopathologic and molecular features of sporadic microsatellite and chromosomal-stable colorectal cancers. *Int J Colorectal Dis* 2008;23(4):365-73.

Carvalho F, Santos EMM, Pena SD, Vettore AL, Lopes A, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Rossi BM. Clinicopathological significance of BAT26 instability in 184 patients with colorectal cancer. *Applied Cancer Res* 2005;25(1):36-40.

Case AS, Zigelboim I, Mutch DG, Babb SA, Schmidt AP, Whelan AJ, Thibodeau SN, Goodfellow PJ. Clustering of Lynch syndrome malignancies with no evidence for a role of DNA mismatch repair. *Gynecol Oncol* 2008;108(2):438-44.

Chammas R, Nowak EM. Mecanismos de invasão e metástases em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. *Câncer de cólon, reto e ânus*. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.55-62.

Chawengsaksophak K, James R, Hammond VE, Köntgen F, Beck F. Homeosis and intestinal tumours in Cdx2 mutant mice. *Nature* 1997;386(6620):84-7.

Chessin DB, Markowitz AJ, Guillem JG. Síndrome de Peutz-Jeghers. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. Câncer de cólon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.621-9.

Church J, Fazio VW, Lavery IC, Oakley JR, Milsom J, McGannon E. Quality of life after prophylactic colectomy and ileorectal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996;39(12):1404-8.

Church J, McGannon E. Family history of colorectal cancer: how often and how accurately is it recorded? *Dis Colon Rectum* 2000;43(11):1540-4.

Church J, Kiringoda R, LaGuardia L. Inherited colorectal cancer registries in the United States. *Dis Colon Rectum* 2004;47(5):674-8.

Church J, Fazio VW. Polipose adenomatosa familiar, síndrome de Gardner e síndrome de Turcot. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. Câncer de cólon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.609-619.

Cianchi F, Cortesini C, Fantappiè O, Messerini L, Sardi I, Lasagna N, Perna F, Fabbroni V, Di Felice A, Perigli G, Mazzanti R, Masini E. Cyclooxygenase-2 activation mediates the proangiogenic effect of nitric oxide in colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(8):2694-704.

Clapper ML, Coudry J, Chang WC. beta-catenin-mediated signaling: a molecular target for early chemopreventive intervention. *Mutat Res*. 2004;555(1-2):97-105.

Clarizia AD, Bastos-Rodrigues L, Pena HB, Anacleto C, Rossi B, Soares FA, Lopes A, Rocha JC, Caballero O, Camargo A, Simpson AJ, Pena SD. Relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with microsatellite instability and promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancer. *Genet Mol Res* 2006;5(2):315-22.

Corfield AP, Carroll D, Myerscough N, Probert CS. Mucins in the gastrointestinal tract in health and disease. *Front Biosci* 200;6:D1321-57.

Corvello CM, Bevilacqua RAU, Rossi BM, Simpson AJG. A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large Brazilian kindred. *Human Mutation* 1999;13:506-8.

Cornford P, Evans J, Dodson A, Parsons K, Woolfenden A, Neoptolemos J, Foster CS. Protein kinase C isoenzyme patterns characteristically modulated in early prostate cancer. *Am J Pathol* 1999;154(1):137-44.

Coull DB, Lee FD, Anderson JH, McKee RF, Finlay IG, Dunlop MG. Long-term cancer risk of the anorectal cuff following restorative proctocolectomy assessed by p53 expression and cuff dysplasia. *Colorectal Dis* 2007;9(4):321-7.

Cristofaro G, Lynch HT, Caruso ML, Attolini A, DiMatteo G, Giorgio P, Senatore S, Argentieri A, Sbanò E, Guanti G, et al. New phenotypic aspects in a family with Lynch syndrome II. *Cancer* 1987;60(1):51-8.

de Jong AE, van Puijenbroek 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.

de la Chapelle A. The incidence of Lynch syndrome. *Fam Cancer* 2005;4(3):233-7.

Dean JC, Fitzpatrick DR, Farndon PA, Kingstn H, Cusine D. Genetic registers in clinical practice: a survey of UK clinical genetics. *J Med Genet* 2000;37(8):636-40.

Debinski HS, Spigelman AD, Hatfield A, Williams CB, Phillips RK. Upper intestinal surveillance in familial adenomatous polyposis. *Eur J Cancer* 1995;31A(7-8):1149-53.

Didiano D, Hobert O. Molecular architecture of a miRNA-regulated 3' UTR. *RNA* 2008;14(7):1297-317.

Dominguez MV, Bastos EP, Santos EM, Oliveira LP, Ferreira FO, Carraro DM, Rossi BM. Two new MLH1 germline mutations in Brazilian lynch syndrome families. *Int J Colorectal Dis* 2008 Jul 2. [Epub ahead of print]

Douglas F, Burn J. Câncer colorretal hereditário sem polipose e síndrome de Muir-Torre. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. Câncer de cólon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.595-600.

Dovrat S, Figer A, Fidder HH, Neophytou P, Fireman Z, Geva R, Zidan J, Flex D, Meir SB, Friedman E. Mutational analysis of hMsh6 in Israeli HNPCC and HNPCC-like families. *Fam Cancer* 2005;4(4):291-4.

Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 1995;268(5219):1909-12.

Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, Wyllie AH, Sharp L, Burn J, Liu B, Kinzler KW, Vogelstein B. Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997;6(1):105-10.

Eng C, Hampel H, de la Chapelle A. Genetic testing for cancer predisposition. *Annu Rev Med* 2001;52:371-400.

Falus A, Molnár V. Closer to the completed unity: messenger and microRNA profiling: an introduction. *Semin Cancer Biol* 2008;18(2):77-8.

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

Fernandes ERQGS. Instabilidade de microssatélites por técnicas de biologia molecular em amostras de pacientes jovens com carcinoma colorretal processadas rotineiramente para diagnostico anátomopatológico. Minas Gerais; 2007. [Dissertação de Mestrado-Universidade Federal de Minas Gerais].

Fishel R. The selection for mismatch repair defects in hereditary nonpolyposis colorectal cancer: revising the mutator hypothesis. *Cancer Res* 2001;61(20):7369-74.

Fitzgibbons RJ Jr, Lynch HT, Stanislav GV, Watson PA, Lanspa SJ, Marcus JN, Smyrk T, Krieger MD, Lynch JF. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987;206(3):289-95.

Foulkes WD. A tale of four syndromes: familial adenomatous polyposis, Gardner syndrome, attenuated APC and Turcot syndrome. *QJM*. 1995;88(12):853-63.

Franco ED, Franco EL. Epidemiologia e fatores de risco em câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. Câncer de cólon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.3-22.

Friederich P, van Heumen BW, Nagtegaal ID, Berkhout M, van Krieken JH, Peters WH, Nagengast FM. Increased epithelial cell proliferation in the ileal pouch mucosa of patients with familial adenomatous polyposis. *Virchows Arch* 2007;451(3):659-67.

Galiatsatos P, Foulkes WD. Familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2006;101(2):385-98.

Garicochea B, Cotti GCC. Poliposes intestinais pouco comuns. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. *Câncer de cólon, reto e ânus*. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.637-43.

Gatalica Z, Torlakovic E. Pathology of the hereditary colorectal carcinoma. *Fam Cancer* 2008;7(1):15-26.

Giraldo A, Gómez A, Salguero G, García H, Aristizábal F, Gutiérrez O, Angel LA, Padrón J, Martínez C, Martínez H, Malaver O, Flórez L, Barvo R. MLH1 and MSH2 mutations in Colombian families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome)--description of four novel mutations. *Fam Cancer* 2005;4(4):285-90.

Gleeson FC, Papachristou GI, Riegert-Johnson DL, Boller AM, Gostout CJ. Progression to advanced neoplasia is infrequent in post colectomy familial adenomatous polyposis patients under endoscopic surveillance. *Fam Cancer* 2008 Jul 23. [Epub ahead of print]

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.

Groves CJ, Beveridge G, Swain DJ, Saunders BP, Talbot IC, Nicholls RJ, Phillips RK. Prevalence and morphology of pouch and ileal adenomas in familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 2005;48(4):816-23.

Gu GL, Wang SL, Wei XM, Bai L. Diagnosis and treatment of Gardner syndrome with gastric polyposis: a case report and review of the literature. *World J Gastroenterol* 2008;14(13):2121-3.

Gylling A, Abdel-Rahman WM, Juhola M, Nuorva K, Hautala E, Järvinen HJ, Mecklin JP, Aarnio M, Peltomäki P. Is gastric cancer part of the tumour spectrum of hereditary non-polyposis colorectal cancer? A molecular genetic study. *Gut* 2007;56(7):926-33.

Halvarsson B, Lindblom A, Rambech E, Lagerstedt K, Nilbert M. The added value of PMS2 immunostaining in the diagnosis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Fam Cancer* 2006;5(4):353-8.

Hendriks YM, de Jong 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.

Iida M, Itoh H, Matsui T, Mibu R, Iwashita A, Fujishima M. Ileal adenomas in postcolectomy patients with familial adenomatosis coli/Gardner's syndrome: incidence and endoscopic appearance. *Dis Colon Rectum* 1989;32(12):1034-8.

Imai K, Yamamoto H. Carcinogenesis and microsatellite instability: the interrelationship between genetics and epigenetics. *Carcinogenesis* 2008;29(4):673-80.

Järvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P. Screening reduces colorectal cancer rate in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology* 1995;108(5):1405-11.

Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer--morphologies, genes and mutations. *Mutat Res* 1994;310(1):125-33.

Jass JR, Young J, Leggett BA. Evolution of colorectal cancer: change of pace and change of direction. *J Gastroenterol Hepatol* 2002;17(1):17-26.

Jass JR. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006;12(31):4943-50.

Jass JR. Colorectal polyposis: From phenotype to diagnosis. *Pathol Res Pract* 2008;204(7):431-47.

Jensen KC, Mariappan MR, Putcha GV, Husain A, Chun N, Ford JM, Schrijver I, Longacre TA. Microsatellite instability and mismatch repair protein defects in ovarian epithelial neoplasms in patients 50 years of age and younger. *Am J Surg Pathol* 2008;32(7):1029-37.

Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000;10(2):157-61.

Kahl-Rainer P, Karner-Hanusch J, Weiss W, Marian B. Five of six protein kinase C isoenzymes present in normal mucosa show reduced protein levels during tumor development in the human colon. *Carcinogenesis* 1994;15(4):779-82.

Kanter-Smoler G, Fritzell K, Rohlin A, Engwall Y, Hallberg B, Bergman A, Meuller J, Grönberg H, Karlsson P, Björk J, Nordling M. Clinical characterization and the mutation spectrum in Swedish adenomatous polyposis families. *BMC Med* 2008;6:10.

Kirk JA. How can we best detect hereditary non-polyposis colorectal cancer? *Med J Aust* 2006;184(5):206-7.

Klein IK, Ritland SR, Burgart LJ, Ziesmer SC, Roche PC, Gendler SJ, Karnes WE Jr. Adenoma-specific alterations of protein kinase C isozyme expression in Apc(MIN) mice. *Cancer Res* 2000;60(8):2077-80.

Knekt P, Järvinen R, Dich J, Hakulinen T. Risk of colorectal and other gastro-intestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite and N-nitroso compounds: a follow-up study. *Int J Cancer* 1999;80(6):852-6.

Kocer B, Soran A, Erdogan S, Karabeyoglu M, Yildirim O, Eroglu A, Bozkurt B, Cengiz O. Expression of MUC5AC in colorectal carcinoma and relationship with prognosis. *Pathol Int* 2002;52(7):470-7.

Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovcova J, Halvarsson B, Clendenning M, Frebourg T, Papadopoulos N, Kinzler KW, Vogelstein B, Peltomäki P, Kolodner RD, Nilbert M, Lindblom A. Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *J Natl Cancer Inst* 2007;99(4):291-9.

Lee CM, Shvartsman H, Deavers MT, Wang SC, Xia W, Schmandt R, Bodurka DC, Atkinson EN, Malpica A, Gershenson DM, Hung MC, Lu KH. beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. *Gynecol Oncol* 2003;88(3):363-8.

Lindblom A, Tannergård P, Werelius B, Nordenskjöld M. Genetic mapping of a second locus predisposing to hereditary non-polyposis colon cancer. *Nat Genet* 1993;5(3):279-82.

Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, Walsh-Vockley C, Petersen GM, Walsh MD, Leggett BA, Young JP, Barker MA, Jass JR, Hopper J, Gallinger S, Bapat B, Redston M, Thibodeau SN. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. *J Clin Oncol* 2002;20(4):1043-8.

Liu Y, Bodmer WF. Carcinogênese colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A. Câncer de cólon, reto e ânus. São Paulo: Lemar/Tecmedd; 2005. p.43-54.

Lopez-Gonzalez JS, Cristerna-Sanchez L, Vazquez-Manriquez ME, Jimenez-Orci G, Aguilar-Cazares D. Localization and level of expression of beta-catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2004;130(1):89-93.

Love RR. Small bowel cancers, B-cell lymphatic leukemia, and six primary cancers with metastases and prolonged survival in the cancer family syndrome of Lynch. *Cancer* 1985;55(3):499-502.

Luebeck EG, Moolgavkar SH. Multistage carcinogenesis and the incidence of colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(23):15095-100.

Lynch HT, Voorhees GJ, Lanspa SJ, McGreevy PS, Lynch JF. Pancreatic carcinoma and hereditary nonpolyposis colorectal cancer: a family study. *Br J Cancer* 1985;52(2):271-3.

Lynch HT, Ens J, Lynch JF, Watson P. Tumor variation in three extended Lynch syndrome II kindreds. *Am J Gastroenterol* 1988;83(7):741-7.

Lynch HT, Ens JA, Lynch JF. The Lynch syndrome II and urological malignancies. *J Urol* 1990;143(1):24-8.

Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an updated review. *Cancer* 1996;78(6):1149-67.

Lynch HT, Shaw TG, Lynch JF, Grady WM. Histórico do câncer colorretal hereditário sem polipose. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. *Câncer de cólon, reto e ânus*. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.575-93.

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.

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

Matsukita S, Nomoto M, Kitajima S, Tanaka S, Goto M, Irimura T, Kim YS, Sato E, Yonezawa S. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6) in mucinous carcinoma of the breast: comparison with invasive ductal carcinoma. *Histopathology* 2003;42(1):26-36.

Mecklin JP, Järvinen HJ, Peltokallio P. Identification of cancer family syndrome. *Gastroenterology* 1986;90(4):1099.

Mecklin JP, Järvinen HJ. Clinical features of colorectal carcinoma in cancer family syndrome. *Dis Colon Rectum* 1986;29(3):160-4.

Mecklin JP, Järvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer* 1991;68(5):1109-12.

Meijers-Heijboer H, Wijnen J, Vasen H, Wasielewski M, Wagner A, Hollestelle A, Elstrodt F, van den Bos R, de Snoo A, Fat GT, Brekelmans C, Jagmohan S, Franken P, Verkuijlen P, van den Ouweland A, Chapman P, Tops C, Möslein G, Burn J, Lynch H, Klijn J, Fodde R, Schutte M. The CHEK2 1100delC mutation identifies families with a hereditary breast and colorectal cancer phenotype. *Am J Hum Genet* 2003;72(5):1308-14.

Menko FH. Genetics of colorectal cancer for clinical practice. Dordrecht: Kluwer Academic; 1993. Familial and hereditary colorectal cancer; p.58-112.

Merritt AJ, Potten CS, Watson AJ, Loh DY, Nakayama K, Nakayama K, Hickman JA. Differential expression of bcl-2 in intestinal epithelia. Correlation with attenuation of apoptosis in colonic crypts and the incidence of colonic neoplasia. *J Cell Sci* 1995;108 (Pt 6):2261-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa/2008 - Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.

Miyaki M, Yamaguchi T, Iijima T, Takahashi K, Matsumoto H, Yasutome M, Funata N, Mori T. Difference in characteristics of APC mutations between colonic and extracolonic tumors of FAP patients: variations with phenotype. *Int J Cancer* 2008;122(11):2491-7.

Moskowitz RL, Shepherd NA, Nicholls RJ. An assessment of inflammation in the reservoir after restorative proctocolectomy with ileoanal ileal reservoir. *Int J Colorectal Dis* 1986;1(3):167-74.

Moussata D, Nancey S, Lapalus MG, Prost B, Chavaillon A, Bernard G, Ponchon T, Saurin JC. Frequency and severity of ileal adenomas in familial adenomatous polyposis after colectomy. *Endoscopy* 2000;40(2):120-5.

Müller 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, Möslein 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.

Murray NR, Jamieson L, Yu W, Zhang J, Gökmen-Polar Y, Sier D, Anastasiadis P, Gatalica Z, Thompson EA, Fields AP. Protein kinase Ciota is required for Ras transformation and colon carcinogenesis in vivo. *J Cell Biol* 2004;164(6):797-802.

Nagasaka T, Goel A, Notohara K, Takahata T, Sasamoto H, Uchida T, Nishida N, Tanaka N, Boland CR, Matsubara N. Methylation pattern of the O6-methylguanine-DNA methyltransferase gene in colon during progressive colorectal tumorigenesis. *Int J Cancer* 2008;122(11):2429-36.

Nakamori S, Ota DM, Cleary KR, Shirotani K, Irimura T. MUC1 mucin expression as a marker of progression and metastasis of human colorectal carcinoma. *Gastroenterology* 1994;106(2):353-61.

Nakamura A, Horinouchi M, Goto M, Nagata K, Sakoda K, Takao S, Imai K, Kim YS, Sato E, Yonezawa S. New classification of pancreatic intraductal papillary-mucinous tumour by mucin expression: its relationship with potential for malignancy. *J Pathol* 2002;197(2):201-10.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science* 2004;303(5663):1483-7.

Nilbert M, Wikman FP, Hansen TV, Krarup HB, Orntoft TF, Nielsen FC, Sunde L, Gerdes AM, Cruger D, Timshel S, Bisgaard ML, Bernstein I, Okkels H. Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam Cancer* 2008 Jun 20. [Epub ahead of print]

Nugent KP, Spigelman AD, Nicholls RJ, Talbot IC, Neale K, Phillips RK. Pouch adenomas in patients with familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1993;80(12):1620.

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: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 2004;3(1):41-7.

Palombo F, Gallinari P, Iaccarino I, Lettieri T, Hughes M, D'Arrigo A, Truong O, Hsuan JJ, Jiricny J. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995;268(5219):1912-4.

Parc YR, Olschwang S, Desaint B, Schmitt G, Parc RG, Tiret E. Familial adenomatous polyposis: prevalence of adenomas in the ileal pouch after restorative proctocolectomy. *Ann Surg* 2001;233(3):360-4.

Park JG, Kim DW, Hong CW, Nam BH, Shin YK, Hong SH, Kim IJ, Lim SB, Aronson M, Bisgaard ML, Brown GJ, Burn J, Chow E, Conrad P, Douglas F, Dunlop M, Ford J, Greenblatt MS, Heikki J, Heinimann K, Lynch EL, Macrae F, McKinnon WC, Möeslein G, Rossi BM, Rozen P, Schofield L, Vaccaro C, Vasen H, Velthuisen M, Viel A, Wijnen J; International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours. Germ line mutations of mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients with small bowel cancer: International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Collaborative Study. *Clin Cancer Res* 2006;12(11 Pt 1):3389-93.

Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, Pylkkänen L, Mecklin JP, Järvinen 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.

Peltomäki P. Lynch syndrome genes. *Fam Cancer* 2005;4(3):227-32.

Perletti GP, Concarì P, Brusaferrì S, Marras E, Piccinini F, Tashjian AH Jr. Protein kinase Cepsilon is oncogenic in colon epithelial cells by interaction with the ras signal transduction pathway. *Oncogene*. 1998;16(25):3345-8.

Perletti G, Marras E, Osti D, Felici L, Zaro S, de Eguileor M. PKCdelta requires p53 for suppression of the transformed phenotype in human colon cancer cells. *J Cell Mol Med* 2004;8(4):563-9.

Pinho M, Rossi BM. Câncer colorretal: Modelo ideal para a compreensão da carcinogênese. In: Rossi BM, Pinho M, editores. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. Lemar; São Paulo: 1999. p.143-72.

Pinto-de-Sousa J, David L, Reis CA, Gomes R, Silva L, Pimenta A. Mucins MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 expression in the evaluation of differentiation and clinico-biological behaviour of gastric carcinoma. *Virchows Arch* 2002;440(3):304-10.

Ponz de Leon M, Sassatelli R, Sacchetti C, Zanghieri G, Scalmati A, Roncucci L. Familial aggregation of tumors in the three-year experience of a population-based colorectal cancer registry. *Cancer Res* 1989;49(15):4344-8.

Potten CS. The significance of spontaneous and induced apoptosis in the gastrointestinal tract of mice. *Cancer Metastasis Rev* 1992;11(2):179-95.

Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, Bryan TM, Hamilton SR, Thibodeau SN, Vogelstein B, Kinzler KW. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992;359(6392):235-7.

Preston SL, Leedham SJ, Oukrif D, Deheregodda M, Goodlad RA, Poulsom R, Alison MR, Wright NA, Novelli M. The development of duodenal microadenomas in FAP patients: the human correlate of the Min mouse. *J Pathol* 2008;214(3):294-301.

Riegert-Johnson DL, Johnson RA, Rabe KG, Wang L, Thomas B, Baudhuin LM, Thibodeau SN, Boardman LA. The value of MUTYH testing in patients with early onset microsatellite stable colorectal cancer referred for hereditary nonpolyposis colon cancer syndrome testing. *Genet Test* 2007;11(4):361-5.

Rocha JCC. Agregação familiar de câncer colorretal. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. Câncer de cólon, reto e ânus. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.601-8.

Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, Myrhøj T, Rozen P, Bertario L, Järvinen HJ, Jass JR, Kunitomo K, Nomizu T, Driscoll DL. Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 1997;225(2):202-7.

Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, Epelman C, Paegle LD, Nakagawa WT, Borges AY, Duarte APM. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *South Am J Cancer* 1997;1(3):191-7.

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

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

Rossi BM, Pinho M. Tumores colorretais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M, editors. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar; 1999. p.173-200.

Rossi BM, Ferreira FO, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Rocha JCC, Lopes A. Câncer colorretal hereditário sem polipose. *Acta Oncol Bras* 2002b;22(1):238-44.

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* 2002a;9(6):555-61.

Rossi BM, Terabe F, Ferreira FO. Tratamento cirúrgico do câncer colorretal hereditário. In: Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, Aguiar Junior S, Lopes A, editores. *Câncer de cólon, reto e ânus*. Lemar/Tecmedd; São Paulo: 2005. p.645-61.

Sakurai M, Zhao Y, Oki E, Kakeji Y, Oda S, Maehara Y. High-resolution fluorescent analysis of microsatellite instability in gastric cancer. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2007;19(8):701-9.

Santarelli RL, Pierre F, Corpet DE. Processed meat and colorectal cancer: a review of epidemiologic and experimental evidence. *Nutr Cancer* 2008;60(2):131-44.

Sarroca C, Alfano N, Bendin GT, Della Valle A, Dominguez A, Quadrelli R, Vaglio A, Mechoso B, Tinley ST, Harty AE, Lynch JF, Franklin BA, Kristo P, Smyrk TC, Peltomäki P, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II) in Uruguay. *Dis Colon Rectum* 2000;43(3):353-60; discussion 360-2.

Sarroca C, Peltomäki P, Alfano N, Tedesco G, Della Valle A, Dominguez A, Lynch HT. Three new mutations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome II) in Uruguay. *Cancer Genet Cytogenet* 2003;142(1):13-20.

Sarroca C, Valle AD, Fresco R, Renkonen E, Peltömaki P, Lynch H. Frequency of hereditary non-polyposis colorectal cancer among Uruguayan patients with colorectal cancer. *Clin Genet* 2005;68(1):80-7.

Silberg DG, Swain GP, Suh ER, Traber PG. Cdx1 and cdx2 expression during intestinal development. *Gastroenterology* 2000;119(4):961-71.

Song S, Byrd JC, Koo JS, Bresalier RS. Bile acids induce MUC2 overexpression in human colon carcinoma cells. *Cancer* 2005;103(8):1606-14.

Soravia C, Bapat B, Cohen Z. Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): a review of clinical, genetic and therapeutic aspects. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127(16):682-90.

Sørensen M, Autrup H, Olsen A, Tjønneland A, Overvad K, Raaschou-Nielsen O. Prospective study of NAT1 and NAT2 polymorphisms, tobacco smoking and meat consumption and risk of colorectal cancer. *Cancer Lett* 2008;266(2):186-93.

Suehiro Y, Wong CW, Chirieac LR, Kondo Y, Shen L, Webb CR, Chan YW, Chan AS, Chan TL, Wu TT, Rashid A, Hamanaka Y, Hinoda Y, Shannon RL, Wang X, Morris J, Issa JP, Yuen ST, Leung SY, Hamilton SR. Epigenetic-genetic interactions in the APC/WNT, RAS/RAF, and P53 pathways in colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2008;14(9):2560-9.

Szaleczky E, Prónai L, Nakazawa H, Tulassay Z. Evidence of in vivo peroxynitrite formation in patients with colorectal carcinoma, higher plasma nitrate/nitrite levels, and lower protection against oxygen free radicals. *J Clin Gastroenterol* 2000;30(1):47-51.

Tashiro Y, Yonezawa S, Kim YS, Sato E. Immunohistochemical study of mucin carbohydrates and core proteins in human ovarian tumors. *Hum Pathol* 1994;25(4):364-72.

Thompson-Fawcett MW, Marcus VA, Redston M, Cohen Z, Mcleod RS. Adenomatous polyps develop commonly in the ileal pouch of patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 2001b;44(3):347-53.

Thompson-Fawcett MW, Marcus V, Redston M, Cohen Z, McLeod RS. Risk of dysplasia in long-term ileal pouches and pouches with chronic pouchitis. *Gastroenterology* 2001a;121(2):275-81.

Tonelli F, Valanzano R, Monaci I, Mazzoni P, Anastasi A, Ficari F. Restorative proctocolectomy or rectum-preserving surgery in patients with familial adenomatous polyposis: results of a prospective study. *World J Surg* 1997;21(6):653-8; discussion 659.

Tzouvala M, Lazaris AC, Papatheodoridis GV, Kouvidou C, Papathomas TG, Kavantzias N, Elemenoglou I, Karamanolis DG, Agapitos E. Potential role of apoptosis and apoptotic regulatory proteins in colorectal neoplasia: correlations with clinico-pathological parameters and survival. *Dig Dis Sci* 2008;53(2):451-60.

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.

Vaccaro CA, Bonadeo F, Roverano AV, Peltomaki P, Bala S, Renkonen E, Redal MA, Mocetti E, Mullen E, Ojea-Quintana G, Benati ML, Rivello HG, Clark MB, Lynch JF, Lynch HT. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) in Argentina: report from a referral hospital register. *Dis Colon Rectum* 2007;50(10):1604-11.

Vasen HF, Offerhaus GJ, den Hartog Jager FC, Menko FH, Nagengast FM, Griffioen G, van Hogezaand RB, Heintz AP. The tumour spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer: a study of 24 kindreds in the Netherlands. *Int J Cancer* 1990;46(1):31-4.

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.

Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116(6):1453-6.

Vasen HF. Clinical description of the Lynch syndrome [hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC)]. *Fam Cancer* 2005;4(3):219-25.

Vasen HF, Boland CR. Progress in genetic testing, classification, and identification of Lynch syndrome. *JAMA* 2005;293(16):2028-30.

Vasen HF, Möslin G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Blanco I, Bülow S, Burn J, Capella G, Colas C, Engel C, Frayling I, Friedl W, Hes FJ, Hodgson S, Järvinen H, Mecklin JP, Møller P, Myrthøi T, Nagengast FM, Parc Y, Phillips R, Clark SK, de Leon MP, Renkonen-Sinisalo L, Sampson JR, Stormorken A, Tejpar S, Thomas HJ, Wijnen J. Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut* 2008;57(5):704-13.

Velcich A, Yang W, Heyer J, Fragale A, Nicholas C, Viani S, Kucherlapati R, Lipkin M, Yang K, Augenlicht L. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. *Science* 2002;295(5560):1726-9.

Walker M, Radley S. Adenocarcinoma in an ileoanal pouch formed for ulcerative colitis in a patient with primary sclerosing cholangitis and a liver transplant: report of a case and review of the literature. *Dis Colon Rectum* 2006;49(6):909-12.

Wang J, Luo MH, Zhang ZX, Zhang PD, Jiang XL, Ma DW, Suo RZ, Zhao LZ, Qi QH. Clinical and molecular analysis of hereditary non-polyposis colorectal cancer in Chinese colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2007;13(10):1612-7.

Weichert W, Gekeler V, Denkert C, Dietel M, Hauptmann S. Protein kinase C isoform expression in ovarian carcinoma correlates with indicators of poor prognosis. *Int J Oncol* 2003;23(3):633-9.

Wong P, Verselis SJ, Garber JE, Schneider K, DiGianni L, Stockwell DH, Li FP, Syngal S. Prevalence of early onset colorectal cancer in 397 patients with classic Li-Fraumeni syndrome. *Gastroenterology* 2006;130(1):73-9.

Wu JS, McGannon EA, Church JM. Incidence of neoplastic polyps in the ileal pouch of patients with familial adenomatous polyposis after restorative proctocolectomy. *Dis Colon Rectum* 1998;41(5):552-6; discussion 556-7.

Zhang L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part II. The utility of microsatellite instability testing. *J Mol Diagn* 2008;10(4):301-7.

ANEXO 1

Hereditary Colorectal Tumors: Routine Care and the Multidisciplinary Therapeutic Approach

B. M. Rossi¹, C. M. Corvello², A. Anelli³, C. Epelman⁴, L. D. Paegle⁵, W. T. Nakagawa¹,
A. Y. Borges¹, C. Amorim³, A. P. M. Duarte², A. Simpson², A. Lopes¹

Summary

Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) are the currently most studied two major groups of hereditary tumors of the large bowel. The main objective of the present study was to describe the routine care for patients with hereditary colorectal tumors and their families. After a suspected diagnosis of FAP or HNPCC, the clinician or surgeon refers the patient to the geneticist who provides information about family history and hereditary aspects of the disease, and counsels about voluntary genetic predisposition tests which are performed after signing an informed consent. The DNA is extracted from peripheral blood lymphocytes. It is important

to note that mutations occurring in hereditary tumors can be detected in any cell of the organism. Such genetic tests identify mutations predisposing the patient to hereditary colorectal tumors, thus permitting the identification of asymptomatic members of a family who are interested to know if they carry the inherited defect. We show preliminary results about 26 families with FAP or HNPCC, emphasizing the importance of the multidisciplinary approach in which oncologists, clinicians or surgeons as well as geneticists, psychologists, enterostomaltherapist nurses and molecular biologists play a fundamental role in the support, counseling, diagnosis and treatment of the patients and their families.

Sumário

Polipose adenomatosa familiar (FAP) e o câncer coloretal não poliposo (HNPCC) são atualmente os dois maiores grupos de tumores hereditários do intestino grosso. O principal objetivo do presente estudo foi descrever os cuidados de rotina com os pacientes com tumores coloretais hereditários e suas famílias. Depois de uma suspeita diagnóstica de FAP ou HNPCC, o clínico ou o cirurgião referem os pacientes ao geneticista, que fornece aconselhamento familiar, aspectos hereditários da doença e testes de predisposição genética, os quais devem ser realizados com consenso informativo. O DNA é extraído de linfócitos do sangue periférico. É importante notar que mutações que ocorrem em tumores hereditários podem ser detec-

tadas em qualquer célula do organismo. Cada teste genético identifica mutações. Os testes genéticos detectam mutações que predispõem ao aparecimento de tumores coloretais hereditários, desta forma permitindo a identificação de indivíduos assintomáticos de uma família que deseja saber se é portadora do defeito hereditário. São mostrados resultados preliminares de 26 famílias com FAP ou HNPCC, enfatizando a importância da intervenção multidisciplinar, na qual oncologistas, clínicos e cirurgiões, bem como geneticistas, psicólogos, enfermeiras enterostomalterapistas e biólogos moleculares tem papel fundamental no suporte, aconselhamento, diagnóstico, aconselhamento e tratamento dos pacientes e suas famílias.

Resumen

La poliposis adenomatosa familiar (FAP) y el cáncer colrectal hereditario no poliposo (HNPCC) son los dos principales tipos de tumores hereditarios del intestino grueso más estudiados actualmente. El principal objetivo del presente estudio fue describir el cuidado rutinario para pacientes con tumores hereditarios colo-rectales y sus familiares. Después de un diagnóstico sospechoso de FAP o HNPCC, el clínico o cirujano remite el paciente al genetista quien provee información sobre la historia familiar y aspectos hereditarios de la enfermedad y aconseja sobre pruebas voluntarias de predisposición genética que son realizadas después de firmar un consentimiento. El DNA es extraído de linfocitos de sangre periférica. Es importante observar que las mutaciones que ocurren en los tumores hereditarios pueden ser detectados en cualquier célula del organismo. Tales pruebas genéticas identifican mutaciones que predisponen al paciente a tumores colo-rectales hereditarios, permitiendo así la identificación de miembros asintomáticos de la familia que

estén interesados en saber si son portadores de este defecto heredado. Mostramos resultados preliminares sobre 26 familias con FAP o HNPCC, enfatizando en la importancia del enfoque multidisciplinario en el cual oncólogos, clínicos o cirujanos, al igual que genetistas, psicólogos, enfermeras enterostomalterapistas y biólogos moleculares juegan un papel fundamental en el soporte, aconsejamiento, diagnóstico y tratamiento de los pacientes y sus familiares.

¹ Department of Pelvic Surgery.

² Ludwig Institute of Cancer Research.

³ Department of Clinical Oncology.

⁴ Psychology Service.

⁵ Enterostomaltherapist Nurse.

A.C. Camargo Hospital, Fundação Antonio Prudente, and the Ludwig Institute of Cancer Research, São Paulo, Brazil.

Introduction

The incidence of colorectal cancer in Brazil in 1996 was 17,000 new cases with a slight predominance of females.¹ This number indicates that colorectal cancer is the fifth most frequent cancer after tumors of the breast, stomach, lung and cervix.¹ At present, about 15% of the colorectal tumors are considered to be hereditary,² i.e., a total of 2,550 new cases per year if we consider the predicted incidence for 1996 in Brazil. Hereditary colorectal tumors can be divided into two groups: familial adenomatous polyposis (FAP) which accounts for about 1% of cancers of the large bowel and hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) which accounts for about 14%.^{2,3}

FAP is an autosomal dominant disease with a penetrance close to 100% which is characterized by the appearance of hundreds to thousands of adenomatous polyps throughout the large bowel³ (Figure 1). Other clinical manifestations associated with polyps of the large bowel can occur with variable incidence such as polyps at other sites of the gastrointestinal tract, osteomas, retinal pigmentation, sebaceous cysts, soft part sarcomas, and tumors of the duodenal papilla and pancreas.^{4,5} The polyps start to grow after puberty, with clinical manifestations occurring between the third and fourth decade of life. Malignant transformation occurs in all non-treated cases (Figure 1) resulting, on average, in death at about 45 years of age.³ This tumor is transmitted vertically from generation to generation without sex

preference, so that the chance of developing polyps is 50% for each child when one of his/her parents carries the disease.³ FAP is one of the currently most studied hereditary diseases caused by alterations in the adenomatous polyposis coli (APC) gene located on the long arm of chromosome 5.^{4,6,7} The APC gene consists of 8,538 nucleotides encoding the 2,843-amino acid APC protein with a molecular mass of 311.8 kDa.^{5,6} The most common alterations occurring in the APC gene are insertions or point mutations generally observed in exon 15 which, in most cases, lead to the synthesis of a truncated APC protein without the function of the wild-type protein.⁸

HNPCC is an autosomal dominant disease with 80% to 90% penetrance and vertical transmission and without sex preference. In contrast to FAP, HNPCC is characterized by the absence of many adenomatous polyps so that the diagnosis is generally made at the cancer stage, since progression from adenomas to adenocarcinomas occurs rapidly.^{2,3,9,10} Muto et al¹¹ suggested that in a general population this transformation takes 10 to 15 years to occur, whereas in patients with HNPCC this process may be accelerated due the lack of efficient DNA repair in the cells,^{12,13,14} thus leading to more aggressive adenomas.¹⁵ However, studies reporting malignant transformation of adenomas within an interval of less than two years in patients with HNPCC are rare.¹⁶ A preference for the right side of the colon has been observed, with the manifestation of the disease occurring, on average, at 45 years of age. HNPCC may be associated

Figure 1. Surgical piece obtained by total proctocolectomy showing innumerable polyps of various size and the area of malignant transformation in the region of the upper rectum.

with cancers of the stomach, pancreas and endometrium/ovary in women.³ According to the Amsterdam criteria,¹⁷ the clinical diagnosis of HNPCC should be made based on the following family characteristics: three family members with colorectal cancer in two different generations, one of whom should be a first-degree relative of the other two and one of whom should be under 50 years of age at the time of diagnosis. It is currently being debated whether fulfillment of all Amsterdam criteria is necessary for the characterization of HNPCC, since in many families with evidence of hereditary colorectal cancer, mainly when the tumor occurs in young patients, HNPCC may not be diagnosed. The main mutations predisposing to HNPCC are located on chromosomes 2 (hMSH2 gene described in 1993) and 3 (hMLH1 gene described in 1994).^{2,16,18-23} In addition, two new genes (hPMS1 and hPMS2) have been recently described which, if mutated, also predispose to HNPCC.^{2,16,18-23}

Material and methods

The establishment of routine care for families with hereditary colorectal tumors is important, mainly for the organization of records, collection of biological material (blood) and follow-up by multidisciplinary treatment.²⁴ It is important to note that mutations predisposing to hereditary tumors are germline mutations which are found in all cells of the body of an affected individual.³

After a suspected diagnosis of hereditary colorectal cancer made by the physician, clinician or surgeon, the patient is referred to the geneticist who provides information about the possibilities of hereditary tumors and their genetic characteristics including the transmission to descendants. In the case of suspect or clinical confirmation of hereditary colorectal cancer, the geneticist counsels the patient about blood collection for genetic analysis in order to

Figure 2. Contrast radiography of the J-shaped pouch constructed by mechanical anastomosis. The pouch was used in the reconstruction of the intestinal passage after total proctocolectomy due to FAP.

Figure 3. Mutation observed in a family with FAP. Insertion of a T nucleotide in codon 1,291, exon 15 of the APC gene.

Sample	Exon	Codon	T insertion
SGO4	15G	1291	AAT CAG ACG → AAT CTA GAC

wild type	AAT	CAG	ACG	ACA	CAG	GAA	GCA	GAT	TCT	GCT	AAT
protein	Asn	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Ala	Asp	Ser	Ala	Asn
⇒											
truncated	AAT	CTA	GAC	GAC	ACA	GGA	AGC	AGA	TTC	TGC	TAA
protein	Asn	Leu	Ala	Ala	Thr	Gly	Ser	Arg	Phe	Cys	Stop

identify mutations predisposing to this pathology. The entire process of DNA collection, packing, storage and sequencing is performed at our institution. The material for genetic analysis is only obtained from individuals older than 18 years. The patients signs a written informed consent form explaining the conditions of the test. The option of excluding individuals under 18 years is first based on the principle that the decision of an individual to learn whether or not he is the carrier of an inherited genetic defect should be personal and respected. Second, FAP and HNPCC are treated in nearly all cases after 18 years of age and, in addition, colonoscopy can be performed in younger individuals. Therefore, excluding younger individuals from genetic tests does not impair treatment.

After diagnosis and collection of biological material (blood) for genetic analysis, a family record is added to the institutional data bank and a pedigree is constructed with a special program for microcomputers. At our institution we use the Cyrillic 2 program which permits, in addition to the construction of a pedigree, the preparation of an individual file card for each family member including all personal and family characteristics. A specialized professional familiar with the record should be in charge of patient registration in the computer, copying and updating the data, calling the patient to the hospital and sending and receiving correspondence.

In parallel to the registration process and treatment, the patients are psychologically accompanied by professionals trained in the care of patients with cancer. The main purpose of this care is to help the patient face the individual and family difficulties associated with acceptance of the diagnosis and treatment of hereditary diseases.

The determination of genetic predisposition to cancer requires the use of different methods developed over the last years. Initially, genetic material is extracted from peripheral blood lymphocytes of each individual. Specific gene sequences are then amplified by the polymerase chain reaction (PCR) using primers corresponding to the gene to be analyzed. The amplified product is analyzed by different methods to identify mutations such as deletions, insertions or nucleotide substitutions. The techniques used permit the detection of alterations in the DNA (single-stranded conformational polymorphism, SSCP) or protein product (protein truncation test, PTT). The mutation is confirmed by sequencing of the amplified DNA fragment.

After identification of the inherited genetic defect in a family, each individual suspected to be a carrier and who has signed the informed consent authorizing the collection and study of his/her genetic material receives the final result of the test in person and under the strictest confidence.

Each member of a given family is treated according to the type of hereditary tumor and its staging in the same way as a patient with sporadic colorectal tumor. In the case of FAP, the basic surgical treatment is removal of the large bowel. In patients with a few polyps in the rectum, the large bowel may be preserved by reconstructing the intestinal passage with an ileorectal anastomosis. However, in most cases removal of the rectum is also necessary followed by reconstruction of the intestinal passage by ileoanal anastomosis. In this case, the construction of an ileal reservoir, generally J-shaped, is necessary to increase the capacity of the patient to retain feces. The ileal reservoir and anastomoses can be con-

Figure 4. Pedigree of a family with FAP. The mutation is shown in Figure 3.

structed using manual or mechanical sutures (Figure 2).

The indication of treatment of HNPCC is more complex than that of FAP since there are no benign adenomatous polyps which develop for years before malignant transformation, thus permitting planned surgery. A controversial aspect in the treatment of HNPCC is whether or not to perform prophylactic colectomy in asymptomatic patients who, however, carry the genetic defect. Since the penetrance of the disease is 80 to 90%, a number of patients would be submitted to unnecessary surgery. When it is not known whether the individual carries the inherited genetic defect, the patient should be closely followed up with annual colonoscopy, while colectomy is only indicated in cases which develop colorectal lesions. It should be also noted that a patient with HNPCC has a 40% higher risk to develop a new colorectal tumor.²⁵ Therefore, we suggest that patients known to carry a genetic defect predisposing to HNPCC should be submitted to total colectomy with periodic follow-up of the remaining rectum.¹⁶ This decision should be made together with the patient who should be aware of and agree with the pros and cons of the proposed treatment since, as mentioned before, there is no established standard conduct for asymptomatic patients carrying a genetic defect predisposing to HNPCC.²⁶

Results

Six families with FAP and 20 with HNPCC are currently registered in our data bank, with the num-

ber of members per family ranging from 6 to 300. Four families with FAP were tested for predisposing mutations in the APC gene. The first family possessed a T insertion in codon 1,291 (exon 15) (Figure 3). This insertion caused a frameshift mutation in the DNA leading to a truncated APC protein without adequate function which in turn resulted in polyp formation.²⁷ The second family had a mutation which has not yet been identified, but may be probably located on less common exons. The mutation observed for the first family has not been described in the literature as a cause of FAP. Figures 4 and 5 show the pedigrees of the two families. Fifteen patients in the six families with FAP were submitted to total proctocolectomy. Thirteen of these patients were submitted to reconstruction using an ileal bag and anal anastomosis and two were submitted to definite ileostomy due to obesity and a thin intestine with a short mesentery which makes it impossible to reach the anus for anastomosis.

There were 20 families with a clinical suspicion of HNPCC, some of them well characterized whereas others did not meet all Amsterdam criteria. The identification of the respective genetic defects is currently underway but definite results have not yet been obtained. Until the final result of the genetic predisposition tests, family counseling, treatment and follow-up will be performed based on clinical data, colonoscopy and family history.

The multidisciplinary approach used for the families cited above was extremely positive since, besides reaching the therapeutic objectives, a bond of trust in the physician-patient relationship was formed, mainly regarding family counseling.

Discussion

Over the last years important progress has been made in the genetic study of tumors with a general familial character. With respect to hereditary colorectal tumors, the molecular diagnosis of asymptomatic carriers of these pathologies became possible with the identification of genes associated with FAP and HNPCC, permitting close monitoring of the affected members including psychological, genetic and family counseling.

In the United States and Europe, there are several services specialized in the care of families with hereditary tumors. According to the National Cancer Institute of the United States (NCI) 41 such centers existed in the U.S. in 1995.²⁸ In Brazil, this is the first paper about the appropriate structure for overall care of these families from the first visit and registration, with psychological counseling, genetic counseling and molecular diagnosis.

Some authors have proposed models of care. Lynch et al²⁹ proposed a model of genetic evaluation of hereditary cancer including a questionnaire, clinical support and family meetings and education. Li et

al³⁰ recommended a complete family history, physical examination, laboratory and psychological tests, psychological and genetic counseling as well as a long-term support program. Mulvihill³¹ pointed out that the care for families with hereditary tumors should be total, including formal genetic counseling both at the time of diagnosis and during patient treatment and follow-up, with a full explanation of the risk for the disease and its transmission for each mem-

ber of the family.

A very important point is information about the subject both for physicians, starting at the time of academic training, and for the population in general, since this will permit more diagnoses of families with hereditary tumors, not only of the colorectal type, and referral to tertiary or specialized care centers for treatment at an early stage when a fatal outcome could still be prevented.

Figure 5. Pedigree of a family with FAP whose mutation has not yet been detected, although involvement of the most common regions of the APC gene has been ruled out.

References

1. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1996: Rio de Janeiro, Pro-Onco, p 19, 1996
2. Rodriguez-Bigas MA, Lee PHU, O'Malley L, et al: Establishment of a hereditary nonpolyposis colorectal cancer registry. *Dis Colon Rectum* 39:649-653, 1996
3. Menko FH: Familial and hereditary colorectal cancer. In: Menko FH (ed): *Genetics of colorectal cancer for clinical practice*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers pp 58-112, 1993
4. Sanabria JR, Croxford R, Berk T, et al: Familial segregation in the occurrence and severity of periampullary neoplasms in familial adenomatous polyposis. *Am J Surg* 171:136-141, 1996
5. Valanzano R, Cama A, Volpe R, et al: Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Cancer* 78:2400-2410, 1996
6. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, et al: Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 329:1982-1987, 1993
7. Bérout C, Soussi T: APC gene: database of germline and somatic mutations in human tumors and cell lines. *Nucleic Acid Res* 24:121-124, 1996
8. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, et al: Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 10:1719-1721, 1993
9. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J: Clinical and molecular genetic aspects of the Lynch syndromes. *Semin Colon Rectal Surg* 6:38-47, 1995
10. Lynch HT, Watson P, Lanspa S, et al: Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 31:439-444, 1988
11. Muto T, Bussey HJ, Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36:2251-2270, 1975
12. Jass JR, Stewart SM: Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33: 783-6.
13. Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR: Hereditary non-polyposis colorectal cancer: morphologies, genes and mutations. *Mutat Res* 290:125-133, 1994a
14. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al: Pathology of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 14:1631-1634, 1994
15. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P: Screening reduces colorectal cancer rate in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Gastroenterology* 108:1405-1411, 1995
16. Lynch HT: Is there a role for prophylactic total colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 39:109-110, 1996
17. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT: The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34:424-425, 1991
18. Peltomäki P, Aaltonen LA, Sistonen P, et al: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260:810-812, 1993
19. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al: Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 75:1215-1225, 1993
20. Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, et al: The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer [published erratum appears in *Cell* 77:167, 1994]. *Cell* 75:1027-1038, 1993
21. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al: Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 263:1625-1629, 1994
22. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al: Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 371:75-80, 1994
23. Marra G, Boland CR: Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87:1114-1127, 1995
24. Garber J, Patenaude AF: Ethical, social and counselling issues in hereditary cancer susceptibility. *Cancer Surveys* 25:381-397, 1995
25. Fitzgibbons R, Lynch HT, Stanislav G, et al: Recognition and treatment of patients with hereditary non-polyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987 206:289-295, 1995
26. Rodriguez-Bigas MA: Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary non-polyposis colorectal cancer: Has the time come? *Cancer* 78:199-201, 1996
27. Medeiros AC: Estudo da alteração genética do gene supressor de tumor em polipose adenomatosa colônica em tumores sólidos humanos. São Paulo, 1995. Tese - Doutorado - Instituto de Química da Universidade de São Paulo. São Paulo, 1995
28. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA et al: Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancer Centers. *J Natl Cancer Inst* 87:1446-1455, 1995
29. Lynch HT, Fitzsimmons ML, Lynch J, Watson P: A hereditary cancer consultation clinic. *Nebr Med J* 74:251-259, 1989
30. Li FP, Garber JE, Friend SH, et al: Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* 84:1156-1160, 1992
31. Mulvihill JJ: Genetic counseling of the cancer patient. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors: *Cancer: principles and practice of oncology*. Vol 2, 4th ed., Philadelphia: Lippincott, pp 2529-2537, 1993

ANEXO 2

ARTIGO DE REVISÃO

TUMORES COLORRETAIS HEREDITÁRIOS

HEREDITARY COLORECTAL TUMORS

Benedito Mauro Rossi, TCBC-SP¹
 Mauro de Souza Leite Pinho, TCBC-SC²
 Wilson Toshihiko Nakagawa¹
 Luis Fernando Pinto Johnson¹
 Ademair Lopes, TCBC-SP³

RESUMO: Cerca de 4% a 15% dos tumores colorretais são hereditários e divididos em dois grupos: polipose adenomatosa familiar (FAP) e câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). Ambas são doenças autossômicas dominantes, com transmissão vertical, geração após geração, sem preferência por sexo. A FAP tem penetrância praticamente completa, caracterizada por mais de cem pólipos adenomatosos no intestino grosso, que aparecem em geral após a puberdade e se transformam em câncer em todos os casos não tratados, levando o paciente ao óbito em torno dos 45 anos de idade. Manifestações extracolônicas são comuns, tais como: pólipos em estômago e duodeno, sarcomas abdominais, pigmentação de retina, osteomas, entre outras. A FAP é causada por mutação no gene *APC*, que está localizado no cromossomo 5q. Seu tratamento é basicamente cirúrgico, com retirada do intestino grosso, podendo-se preservar o reto, se este não apresentar muitos pólipos. O HNPCC tem penetrância em torno de 80% e não apresenta os pólipos benignos como na FAP, que permitem identificar pacientes com o fenótipo da doença. Geralmente, o diagnóstico da lesão colônica é realizado já na fase maligna, em torno dos 45 anos de idade, com preferência para o lado direito do cólon. Pode haver associação com tumores de endométrio na mulher, estômago, pâncreas, entre outros. É causada por mutação em genes de reparo do DNA (*hMSH2*, *hMLH1*, *hPMS1*, *hPMS2*, *hMSH6/GTBP*). A colectomia total deve ser realizada em pacientes com câncer de cólon e HNPCC. Se o tumor estiver localizado no reto, a proctocolectomia total pode ser uma opção. Em indivíduos portadores do defeito genético predisponente ao HNPCC, porém, assintomáticos, a indicação de cirurgias profiláticas é controversa. Atualmente, podem-se identificar indivíduos portadores de defeito genético herdado tanto na FAP como no HNPCC. Esses testes baseiam-se no estudo direto dos genes responsáveis pela respectiva doença ou pela proteína produto dos mesmos. É de suma importância uma abordagem multidisciplinar de pacientes portadores de FAP ou HNPCC, pois existe uma preocupação ética muito grande na realização dos testes genéticos de predisposição, considerando suas consequências psicológicas e sociais.

Unitermos: Polipose adenomatosa familiar; FAP; Adenoma; Câncer colorretal hereditário sem polipose; HNPCC; Testes genéticos.

INTRODUÇÃO

O organismo humano é composto por células somáticas e germinativas. As células somáticas dividem-se por mitose, constituindo a maior parte dos tecidos humanos. No intestino grosso, o objetivo maior das mitoses é a reposição das células da mucosa que morrem naturalmente de forma programada,

processo chamado de apoptose. As células germinativas dividem-se por meiose, sendo representadas pelos gametas, ligados à reprodução e transmissão de características hereditárias, inclusive defeitos genéticos predisponentes para tumores colorretais.

A carcinogênese colorretal é complexa, multicausal e composta de várias fases. Entre os possíveis agentes causais

1. Médico Titular do Departamento de Cirurgia Pélvica
2. Cirurgião do Departamento de Cirurgia do Hospital São José de Joinville - SC.
3. Diretor do Departamento de Cirurgia Pélvica.

Recebido em 3/2/97

Aceito para publicação em 22/6/98

Trabalho realizado no Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A. C. Camargo.

estão os fatores extrínsecos, principalmente relacionados à dieta rica em gorduras animais e pobre em fibras vegetais, que podem levar as células colônicas a mutações genéticas adquiridas, também chamadas de somáticas. Mutações herdadas, ou germinativas também podem ser consideradas como fatores causais iniciais importantes no aparecimento do câncer colorretal (CCR), pois indivíduos que já nascem com esses defeitos genéticos têm os primeiros passos da carcinogênese completos, aumentando a chance e diminuindo o tempo para o aparecimento do tumor.¹

Não houve alteração significativa na taxa de cura do CCR nas últimas décadas, porém, com os avanços no campo da genética molecular enfocando principalmente a progressão tumoral, o entendimento dos mecanismos de carcinogênese torna-se dia a dia mais próximo. Alguns estudos demonstram claramente que o câncer é uma doença genética, ou seja, relacionada a mutações nos genes que comandam o equilíbrio da divisão celular.² Esse equilíbrio é dado basicamente pelo funcionamento harmônico de dois tipos de genes: os *oncogenes* e os *genes supressores de tumor*. O primeiro grupo estimulando e o segundo freando a divisão celular.

O CCR quase sempre tem início em pólipos adenomatosos,¹ e entender o processo de transformação dessas lesões não é função apenas de biólogos moleculares, pois todos os profissionais envolvidos no tratamento dos pacientes devem estar afeitos à essa fisiopatologia. Além das alterações genéticas predisponentes ao CCR estarem relacionadas ao prognóstico de sobrevida, seu conhecimento abre novos caminhos para o diagnóstico pré-clínico da doença, possibilitando a identificação, acompanhamento e tratamento precoce dos pacientes.

TUMORES COLORRETAIS HEREDITÁRIOS

A incidência de CCR no Brasil em 1996 foi de 17 mil casos novos, com uma discreta predileção pelo sexo feminino.³ Esse número demonstra que é o quinto tumor mais frequente, ficando atrás do câncer de mama, estômago, pulmão e colo uterino.³ Atualmente, existe controvérsia sobre a incidência do CCR hereditário, com variação na literatura entre 6% e 15%.⁴ Assim sendo, se considerarmos a incidência global de CCR no Brasil em 1996 somaríamos um total absoluto entre 1.020 e 2.550 casos de tumores hereditários por ano.

Os CCR hereditários podem ser divididos em dois grupos: a polipose adenomatosa familiar (FAP), que representa cerca de 1%, e o câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC), que representa entre 5% e 14% das causas de câncer no intestino grosso.¹⁰⁻¹²

Essa variação de incidência está na dependência do critério usado para caracterização do HNPCC, alguns mais rígidos, outros mais maleáveis. É de suma importância que critérios padronizados internacionalmente sejam estabelecidos e seguidos, pois só assim saberemos a verdadeira incidência da doença.

Polipose adenomatosa familiar (FAP)

A FAP é uma doença autossômica dominante, com penetração próxima de 100%, e se caracteriza pela presença de mais de cem pólipos adenomatosos no intestino grosso, podendo esse número chegar até a milhares.⁵ (Figura 1).

Figura 1 – Peça cirúrgica de proctocolectomia total demonstrando polipose adenomatosa familiar com área de transformação carcinomatosa em reto alto

Geralmente, os pólipos começam a crescer após a puberdade, com manifestações clínicas entre a terceira e quarta décadas de vida, sendo que a transformação maligna ocorre em todos os casos não tratados (Figura 1), levando ao óbito, em média, em torno dos 45 anos de idade.⁵ Porém, existe descrição de criança abaixo de 10 anos de idade com FAP estabelecida, apresentando deleção de cinco pares de base no códon 1309 do gene *APC*.⁶

Podem ocorrer, com incidência variável, outras manifestações clínicas associadas em pacientes portadores de FAP. Pólipos em outras localizações do trato gastrointestinal, principalmente no duodeno e região da papila duodenal, são extremamente comuns, com incidência em torno de 70% dos pacientes com FAP. Após o diagnóstico endoscópico, esses pacientes devem ser seguidos rigorosamente e submetidos à ressecção de qualquer lesão suspeita, tanto pelo seu tamanho como pelo crescimento rápido, pois elas apresentam potencial de malignização.⁷

Osteomas também podem ocorrer, geralmente em mandíbula ou maxila, como demonstrado na figura 2; porém, espessamentos corticais de ossos longos são os achados mais comuns em algumas séries, podendo ser a única manifestação extracolônica da FAP.

Figura 2 – Paciente portador de FAP com osteoma de mandíbula e radiografia simples correspondente

Lesões pigmentadas de retina são comuns, chegando a acometer cerca de 80% dos casos de FAP ao nascimento, podendo servir como um bom marcador clínico congênito para o diagnóstico da doença, principalmente nos casos onde as mutações ocorrem na porção proximal do exon 15 do gene *APC*.⁸

Lesões de pele, geralmente descritas como cistos sebáceos, também são relatadas como mais comuns na face, pescoço e braços, porém, podem ocorrer em qualquer parte do corpo e com incidência variável.

Os fibrossarcomas de baixo grau de malignidade, também chamados na literatura de tumores desmóides, ocorrem em cerca de 10% dos pacientes com FAP. Geralmente são intra-abdominais (mesentéricos ou de parede abdominal) e constituem importante causa de morte em casos tratados dos pólipos colônicos.⁹ O único tratamento efetivo para os tumores desmóides, apesar das altas taxas de recidiva, é o cirúrgico, através de uma ressecção adequada dentro dos padrões da cirurgia oncológica. O uso de medicações, tais como antiinflamatórios não hormonais, agentes antiestrogênicos e esteróides, tem sido indicado em casos irrecutíveis, porém, com resultados desanimadores a longo prazo na maioria dos casos.¹⁰

Tumores do sistema nervoso central também são descritos em associação com FAP (*Brain Tumor Polyposis* – BTP síndrome tipo 2), onde ocorrem mutações germinativas no gene *APC*. Outra síndrome, chamada BTP tipo 1, é descrita em pacientes portadores de gliomas e adenomas colorretais, mas sem a presença de polipose. Nestes casos não são encontradas mutações no gene *APC*, mas sim em genes de reparo, levando a erros de replicação no DNA, o que poderia sugerir associação com HNPCC.¹¹

Tumores de supra-renal têm sido descritos como mais incidentes em pacientes com FAP, mas esses achados podem ser devidos à realização rotineira de exames de imagem aumentando o número de casos diagnosticados involuntariamente.¹²

A associação da FAP com carcinoma papilífero de tireóide é rara, com descrição de menos de cinquenta casos na literatura, mas deve ser lembrada.¹³

A FAP é transmitida verticalmente, geração após geração, sem preferência por sexo, sendo que cada filho de um casal com um cônjuge portador da doença tem 50% de chance de desenvolver pólipos.⁵ É uma das doenças hereditárias mais estudadas atualmente, causada por alterações no gene supressor de tumores *APC* (*Adenomatous Polyposis Coli*), localizado no braço longo do cromossomo 5 (5q).¹⁴ O gene *APC* possui 8.538 nucleotídeos que codificam a proteína APC, com 2.843 aminoácidos e peso molecular de 311,8 kDa.¹⁵ Apesar das mutações herdadas que inativam o gene *APC* serem raras, como no caso da FAP (1% dos CCR), mutações somáticas ou adquiridas na mucosa colônica são comuns nesse gene em pacientes portadores de CCR esporádico. Essas mutações adquiridas do cromossomo 5q geralmente ocorrem às custas de perda de heterozigiosidade (LOH), ou também chamada de perda alélica.^{1,16} Explicando melhor, quando analisamos o gene, apesar de apenas um dos alelos herdados estar afetado grosseiramente na célula tumoral (perda de alelo, por exemplo), a cópia remanescente do gene supressor no outro alelo, aparentemente normal, apresenta alterações mais sutis, tais como mutações pontuais, pequenas inserções ou deleções, levando à sua inativação.¹⁷ Cerca de 50% dos CCR esporádicos apresentam LOH para o cromossomo 5q, região em que está localizado o gene supressor *APC*,^{1,17} de forma muito semelhante às mutações encontradas nas famílias portadoras de FAP. Pequenos adenomas e cerca de dois terços de todos os CCR apresentam mutações no gene *APC*.^{1,17} Estudos preliminares parecem mostrar que o gene supressor *APC* tem uma ação na regulação da expressão do oncogene *c-myc*, e uma perda dessa regulação seria responsável pela hiperexpressão de *c-myc* no CCR.^{1,18}

Na FAP, as alterações mais comuns que ocorrem no gene *APC* são inserções ou mutações pontuais, geralmente no exon 15, que na maioria dos casos levam à produção de uma proteína APC truncada, sem a função da proteína selvagem ou original.¹⁹

Uma das famílias registradas no Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, apresenta uma mutação tipo inserção

no códon 1291, exon 15G, do gene *APC*, o que causa uma mudança na fase de leitura na fita de DNA, levando a um "stop codon" alguns nucleotídeos adiante, como demonstrado na Figura 3.⁴ Isso faz com que a proteína produzida não esteja completa (proteína truncada) e, conseqüentemente, sem sua função normal. No caso desta família houve manifestação de um fenótipo agressivo no intestino grosso, com vários casos de malignização de pólipos em idade precoce, e de várias manifestações extracolônicas (Figura 4).

Amostra	Exon	Codon	Inserção de "T"
SG04	15G	1291	AAT CAG ACG → AAT CTA GAC

Proteína	>AAT CAG ACG ACA CAG GAA GCA GAT TCT GCT AAT>
Selvagem	Asn Gin Thr Thr Gin Glu Ala Asp Ser Ala Asn
⇒	
Proteína	>AAT CTA GAC GAC ACA GGA AGC AGA TTC TGC TAA /
Mutada	Asn Leu Ala Ala Thr Gly Ser Arg Phe Cys Stop

Figura 3 – Mutação no gene *APC* levando a uma proteína truncada em família com FAP

Graças ao desenvolvimento de testes que analisam proteínas sintetizadas *in vitro* (IVSP) ou testes de proteína truncada (PTT), hoje é possível detectar uma proteína defeituosa produto do gene *APC* alterado.¹⁵ Na análise IVSP, o DNA do indivíduo a ser testado é extraído de linfócitos do sangue periférico, amplificado e transcrito em RNA, o qual é traduzido na respectiva proteína, que por sua vez é estudada através de eletroforese em gel. Uma pessoa sem FAP, ou seja, com dois alelos normais, produz apenas uma banda no gel (os dois alelos produzem a mesma proteína APC normal); porém, um paciente portador de FAP, com mutação que leva a uma proteína truncada, produz duas bandas, uma conseqüente à proteína normal e outra à proteína truncada.²⁰

Pacientes com fenótipo de FAP, mas sem manifestações extra-intestinais, podem não apresentar proteína APC truncada, ao passo que mutações nos códons 1465, 1546 e 2621 estão associadas à multiplicidade das manifestações extracolônicas.²¹

Uma mutação comumente encontrada em FAP está localizada no códon 1309, no exon 15G do gene *APC*, associada com um fenótipo agressivo aparecimento mais precoce da doença e geralmente com necessidade de cirurgias mais amplas incluindo a retirada do reto.²²

Além desse teste, outra maneira de se realizar o teste genético para identificação de portadores de FAP é através do sequenciamento direto do gene *APC*. Após a extração do DNA de linfócitos do sangue periférico, é realizada amplificação do segmento específico que contém o gene *APC* utilizando-se iniciadores de reação também específicos, através da técnica de PCR (*polymerase chain reaction*). Assim, utilizando-se sequenciador automático computadorizado, teremos o gene *APC* de ponta a ponta, com todos os nucleotídeos, possi-

Figura 4 – Heredograma de família portadora de FAP com vários casos de CCR

bilitando a identificação de alterações sutis como a demonstrada na figura 3.

É de suma importância lembrar que o primeiro teste genético dentro de uma nova família de FAP deve ser realizado em um indivíduo sabidamente portador do fenótipo da doença. No caso de indivíduos sem o fenótipo da doença, poderíamos encontrar um resultado negativo para o teste e não saberíamos dizer se aquela família não possui a doença hereditária ou se aquele membro específico não herdou o defeito genético.

Tratamento da FAP

O tratamento de pacientes com FAP é basicamente cirúrgico, com a retirada do intestino grosso. Em pacientes com poucos pólipos no reto, este pode ser preservado, reconstruindo-se o trânsito intestinal com uma anastomose íleo-retal (colectomia total).²³ Pacientes submetidos a esse tipo de cirurgia devem ser acompanhados rigorosamente devido ao risco de transformação maligna dos pólipos adenomatosos retais remanescentes. Se durante o acompanhamento houver suspeita de transformação ou aumento dos pólipos retais, o paciente deve ser reoperado para retirada do reto, preferencialmente com preservação da função esfinteriana e da inervação pélvica.

No caso de muitos pólipos no reto, existe a necessidade de sua retirada de início. A cirurgia indicada é a proctocolecotomia total com preservação da função esfinteriana e da inervação pélvica, sendo que a reconstrução do trânsito intestinal é realizada através de anastomose íleo-anal.

A realização de um reservatório ileal, usualmente em forma de "J", com a finalidade de aumentar a capacidade do paciente para reter as fezes⁴ se faz necessária, como demonstrado na figura 5.

Figura 5 – Radiografia contrastada demonstrando reservatório ileal em “J” utilizado para reconstrução do trânsito intestinal após proctocolectomia total em paciente portador de FAP

O reservatório ileal e as anastomoses podem ser realizadas através de suturas manuais ou mecânicas. No caso da anastomose mecânica, esta é realizada pela técnica do duplo grampeamento, que não permite a retirada do anel mucoso entre a linha pectínea e a linha de secção do reto. Acreditava-se que essa mucosa remanescente mantinha os riscos de malignização, porém, com o passar do tempo observou-se que este fato não ocorre na prática, consagrando a técnica do duplo grampeamento como sendo a de primeira escolha, exceto em casos onde o canal anal acarpelado de pólipos não permita sua realização. Nestes pacientes, a mucosectomia do canal anal (entre a linha pectínea e linha de secção do reto) deve ser realizada, tomando-se cuidado para não causar lesão do esfíncter interno do ânus, reconstruindo-se o trânsito intestinal através de uma anastomose coloanal transanal manual, como a proposta por Parks.²⁴

Atualmente, existe uma tendência na indicação da proctocolectomia total, pois a morbidade cirúrgica é relativamente baixa, com falha da bolsa ileal em torno de 7,7%, geralmente por sepe pélvica.²⁵ Essa cirurgia evita que o paciente sofra futura intervenção para retirada do reto, já que a chance de transformação maligna deste é de cerca de 25% em até 13 anos.²⁶ Em casos de FAP onde já existe a transformação maligna dos pólipos adenomatosos, a cirurgia deve seguir os padrões clássicos da cirurgia oncológica, no que diz respeito às margens, linfadenectomias regionais e ressecção fechada do mesorreto.

Existem medicamentos que visam causar a regressão dos pólipos do intestino grosso em pacientes com FAP. O mais conhecido é o sulindac, um antiinflamatório não-hormonal. Os resultados de tratamento utilizando-se essa droga são controversos, sendo que alguns estudos mostram respostas parciais nos pólipos localizados no coto retal após colectomia total. A mesma droga não tem ação na regressão de pólipos duodenais.²⁷

Com a evolução e a padronização do tratamento cirúrgico da FAP no que diz respeito ao intestino grosso, as causas de óbito desses pacientes têm mudado nos últimos anos, deixando de ser por CCR e passando a ser geralmente devido às manifestações extracolônicas, principalmente os sarcomas abdominais.²⁸

Por se tratar de uma doença hereditária, como já vimos, causada por defeito genético específico, acreditamos que qualquer tratamento clínico que não tenha ação diretamente na célula, no sentido de corrigir a falha do DNA, terá no máximo um efeito transitório.

Câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC)

Descrita pela primeira vez há um século por Aldred Warthin, através da “Família G”, o HNPCC é uma doença autossômica dominante, com penetrância entre 80% e 90%, transmissão vertical e sem preferência por sexo.²⁹ Os pacientes não apresentam as centenas de pólipos adenomatosos como na FAP, o que dificulta a identificação clínica de portadores da doença; assim sendo, o diagnóstico geralmente é realizado já na presença de CCR.

Alguns estudos demonstram que a evolução do adenoma para o adenocarcinoma ocorre de forma mais rápida comparativamente às lesões esporádicas.⁵ Muto et al³⁰ sugerem que na população essa transformação demore entre 10 e 15 anos para ocorrer. Porém, em pacientes com HNPCC esse processo seria mais acelerado pela falta de eficiência nos processos naturais da célula no reparo do DNA,³¹ o que tornaria os adenomas mais agressivos.³² Apesar disso, relatos de transformação maligna em intervalo menor que dois anos são raros.

Quando comparamos HNPCC com CCR esporádico, notamos predileção para acometimento do cólon direito (68% versus 49%), maior incidência de CCR sincrônico (7% versus 1%), maior incidência de CCR metacrônico em dez anos (29% versus 5%), manifestação mais precoce da doença, geralmente entre 40 e 45 anos de idade, além de melhores resultados de sobrevida em cinco anos, talvez explicados pelo maior número de diagnósticos precoces nestas famílias.³³ Pode haver associação com tumores de estômago, pâncreas, pelve renal, intestino delgado e de endométrio na mulher.^{5,34} Muitas vezes, o aparecimento de tumores extracolônicos em outros membros da mesma família podem indicar a presença da doença, apesar dos critérios de Amsterdam não incluírem essas lesões.

Segundo os critérios de Amsterdam, o diagnóstico clínico do HNPCC deve ser realizado baseado nas seguintes características da família: três membros com CCR em duas gerações diferentes, sendo que um deles deve ser parente em primeiro grau dos outros dois e um deles com menos de 50 anos de idade. Atualmente, existe controvérsia quanto à necessidade de cumprimento integral desses critérios para a caracterização da HNPCC, pois poderíamos deixar de realizar o diagnóstico em muitas famílias onde existem evidências de CCR hereditário, principalmente quando pacientes jovens são acometidos.³⁵ Além disso, estaríamos excluindo os casos de

Tabela 1

Critérios de Bethesda para indicação de teste genético para instabilidade de microssatélites em pacientes portadores de tumores relacionados ao HNPCC.⁵⁸

1. Indivíduos com câncer que preenchem os critérios de Amsterdam.
2. Indivíduos com dois tumores relacionados ao HNPCC, incluindo CCR sincrônico e metacrônico, ou tumores extracolônicos (endométrio, ovário, estômago, hepatobiliar, intestino delgado, células transicionais de pelve renal e ureter).
3. Indivíduos portadores de CCR e um parente em primeiro grau com CCR e/ou tumores extracolônicos relacionados ao HNPCC e/ou adenomas colorretais. Um dos tumores diagnosticados antes dos 45 anos e os adenomas antes dos 40 anos de idade.
4. Indivíduos com CCR ou câncer de endométrio diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
5. Indivíduos com CCR em cólon direito com padrão histológico indiferenciado diagnosticado antes dos 45 anos de idade (padrão sólido/cribriforme*)
6. Indivíduos com CCR com padrão histológico em anel de sinete (mais de 50%) diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
7. Indivíduos com adenomas colorretais diagnosticados antes dos 40 anos de idade.

* Definido como pouco diferenciado ou indiferenciado: carcinoma composto por células eosinofílicas grandes, irregulares e sólidas, contendo pequenos espaços simulando glândulas.

tumores extracolônicos não previstos, por isso, novos critérios têm sido estudados.^{36,37} A tabela 1 demonstra em linhas gerais as características dos pacientes com maior risco de serem portadores de HNPCC, candidatos aos testes genéticos de diagnóstico molecular.³⁴

Famílias com forte evidência clínica de HNPCC, mas sem preenchimento completo dos critérios de Amsterdam, podem ter mutações germinativas encontradas em cerca de 60% das vezes.³⁸ Por outro lado, outros estudos demonstram que a taxa de positividade para mutações nos mesmos genes em famílias com fenótipo típico de HNPCC pode estar entre 25% e 50%.³⁹ Esses resultados controversos indicam a necessidade de maior conhecimento das causas genéticas da doença.

Atualmente, conhecemos os principais genes de reparo que, se mutados, predisõem ao HNPCC e suas respectivas localizações no genoma: gene *hMSH2* (human mutS homolog 2) – braço curto do cromossomo 2 (2p); gene *hMLH1* (human mutL homolog 1) – braço curto do cromossomo 3 (3p); gene *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1) – braço longo do cromossomo 2 (2q); gene *hPMS2* (human postmeiotic homolog 2) – braço curto do cromossomo 7 (7p). Além desses genes, recentemente foi descrito o gene *hMSH6/GTBP*, que também predis põe ao HNPCC, porém, ainda pouco estudado.^{20,34,40} Apesar da controvérsia nos números, parece que metade dos casos diagnosticados de HNPCC pode apresentar mutações no gene *hMSH2*, cerca de 30% no gene *hMLH1*, 5% no *hPMS1*

e 5% no *hPMS2*. A função desses genes é produzir proteínas que reconhecem e reparam o DNA após possíveis erros de replicação, por isso são chamados de genes de reparo (*mismatch repair genes*).

Os genes de reparo desempenham papel de extrema importância na célula, funcionando como verdadeiros controladores de qualidade, reconhecendo e reparando falhas, mantendo a fidelidade do DNA durante a replicação. Essas falhas podem ocorrer por pareamento incorreto das bases ou por deslizamento do enzima DNA polimerase na fita molde durante a divisão.²⁰

A figura 6 demonstra mutação no gene *hMSH2* diagnosticada em família registrada no Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, portadora de HNPCC, que preenche os critérios de Amsterdam. Houve deleção da base G no códon 417, exon 7, mudando a fase de leitura do DNA e levando a uma proteína truncada alguns nucleotídeos adiante. O heredograma da mesma família é demonstrado na figura 7.

> CCT AAT <u>GTT</u> ATA <u>CAG</u> GCT >	Tipo selvagem
417	
> CCT AAT TTA TAC AGG CTC >	Mutado
↳ ↳ ↳ ↳	

Figura 6 – Mutação diagnosticada no gene *hMSH2* em família portadora de HNPCC

O risco de um paciente do sexo masculino portador de mutação herdada predisponente ao HNPCC desenvolver CCR é de 74%, ao passo que as mulheres têm um risco menor, em torno de 30%, porém, com o risco de câncer de endométrio de cerca de 42%, o que reforça a necessidade de acompanhamento ginecológico.⁴¹ Estudos correlacionando o fenótipo com o genótipo de famílias portadoras de HNPCC indicam que mutações no gene *hMSH2* estão relacionadas com maior número de casos de câncer de endométrio associado ao CCR, enquanto mutações no gene *hMLH1* mais relacionadas ao CCR isolado.

Quando tecido tumoral de pacientes portadores de HNPCC é analisado, encontra-se instabilidade genética em seqüências repetitivas de bases no DNA, também chamadas de microssatélites, cuja função ainda é desconhecida. Essa instabilidade ocorre devido a deficiência dos genes de reparo, o que caracteriza esses tumores como positivos para erros de replicação, ou RER+, ou ainda fenótipo RER.⁴¹ Porém, entre 12% e 15% dos pacientes com CCR esporádico, sem história familiar, também podem apresentar testes positivos para RER não causados por mutações somáticas nos genes responsáveis pelo HNPCC, o que indica outro mecanismo de carcinogênese ainda desconhecido.⁴² São indivíduos geralmente jovens, quase sempre abaixo de 40 anos, e com melhor prognóstico de sobrevida quando comparados com aqueles sem fenótipo RER (68% versus 32% em cinco anos).⁴³

Figura 7 – Heredograma da mesma família portadora de HNPCC citada na figura 6

Os testes genéticos usados atualmente para identificação de HNPCC podem ser realizados por análise de IVSP/PTT, da mesma forma como na FAP, ou através de seqüenciamento direto dos quatro genes de reparo mais conhecidos já citados, responsáveis por cerca de 90% dos casos. Importante lembrar que, pelo mesmo motivo exposto para a FAP, o primeiro teste genético em uma família suspeita de HNPCC deve ser feito em um indivíduo portador de CCR.

Outra maneira de se realizar o teste genético é pesquisar o fenótipo RER no tecido tumoral de pacientes suspeitos de HNPCC, mesmo sabendo da possibilidade de resultado falso-positivo em cerca de 15% dos casos, como já comentamos. Nos casos RER+ existe a necessidade de confirmação do resultado do teste através de seqüenciamento direto dos genes de reparo e localização do defeito genético específico.²⁰

Tratamento do HNPCC

A indicação de tratamento no HNPCC é mais complexo do que na FAP, pois não existem as centenas de pólipos adenomatosos benignos que podem se desenvolver até por anos antes da transformação maligna, permitindo uma cirurgia planejada. O aparecimento do CCR em pacientes portadores de HNPCC pode advir de pólipos adenomatosos isolados ou de

carcinomas *de novo*, que, como já vimos, se comportam de forma agressiva.

Para podermos planejar a orientação de pacientes portadores de HNPCC antes do aparecimento do câncer, temos que dividir esses pacientes assintomáticos em três grupos: 1) sabidamente portadores de defeito genético herdado; 2) sabidamente não portadores de defeito genético herdado; 3) sem condições de realizar o teste genético de predisposição.

No primeiro grupo existe controvérsia na realização ou não de uma colectomia total profilática, com anastomose ileorretal, pois como a penetrância do gene que causa a doença está entre 80% e 90%, estaríamos operando um grupo de pacientes desnecessariamente. Além disso, apesar de pequena, existe a morbi/mortalidade do tratamento cirúrgico e a chance de aparecimento de tumores em outros órgãos já citados, inclusive no reto remanescente após colectomia total, que apresenta risco de câncer de 12% em 12 anos.⁴⁴

Como a mutação no HNPCC é herdada ou germinativa, o defeito genético está em todas as células do paciente e não haveria sentido em realizar ressecções múltiplas profiláticas de todos os órgãos alvo, baseando-se no provável fenótipo da doença, inclusive histerectomias.⁴⁵ Entretanto, a controvérsia sobre as cirurgias profiláticas existe, mas com uma tendência mundial em não realizá-las como procedimentos padrão em indivíduos assintomáticos portadores do defeito genético predisponente ao HNPCC. A conduta mais aceita é o seguimento rigoroso com colonoscopia anual ou bianual, iniciando-se com a idade de 25 anos, endoscopia digestiva alta e exames de imagem abdominal e pélvico (ultra-sonografia, tomografia computadorizada ou ressonância nuclear magnética). Ao nosso ver, atualmente, a melhor conduta é o esclarecimento total do paciente e de sua família sobre a doença e todos os riscos de aparecimento de câncer. Assim, uma decisão consciente do paciente em conjunto com o médico e a equipe multidisciplinar deve ser tomada. Alguns autores indicam rotineiramente a colectomia total, referindo tratar-se de um procedimento de baixa morbi/mortalidade, e, que, além de oferecer boa qualidade de vida aos indivíduos a ela submetidos, evitaria o aparecimento do CCR em cerca de 80% dos casos onde o gene teria sua penetrância ativa.⁴⁶

No segundo grupo de pacientes, não há controvérsia, pois como os indivíduos não são portadores do defeito genético, eles têm o mesmo risco da população em geral para desenvolver CCR. Assim sendo, seu seguimento deve ser feito somente em casos com sintomas clínicos específicos.

No terceiro grupo – dos indivíduos assintomáticos que não sabem se são ou não portadores de defeito genético herdado – não deve haver indicação de cirurgias profiláticas, mas sim de seguimento rigoroso com exames periódicos, como se todos fossem portadores do HNPCC (primeiro grupo). Esse seguimento é feito apesar de sabermos que metade dos indivíduos de uma mesma família não apresenta o defeito genético, de acordo com a herança mendeliana clássica para doença genética autossômica dominante, com um dos pais

heterozigoto. Por isso, sempre que possível, devemos realizar testes genéticos para identificar os portadores de mutações predisponentes ao HNPCC, pois estaríamos excluindo 50% dos casos do acompanhamento e dos exames, diminuindo expressivamente custos financeiros e não causando estresse emocional desnecessário.

Nos pacientes que já se apresentam com câncer no cólon, a cirurgia está indicada e deve ser a colectomia total com ileorreto anastomose, pois sabemos do risco aumentado de CCR sincrônico e metacrônico. Mesmo os pacientes submetidos à colectomia total devem realizar retoscopias anuais, devido ao risco elevado de câncer retal. No caso do tumor estar localizado primariamente no reto, existe controvérsia, mas a tendência é que a cirurgia indicada seja a mesma utilizada em pacientes com FAP e comprometimento retal, ou seja, a proctocolectomia total com bolsa ileal em "J" e anastomose coloanal através da técnica de duplo grampeamento, seguindo todos os princípios da cirurgia oncológica clássica.

Orientação genética

O estabelecimento de uma rotina de atendimento das famílias portadoras de CCR hereditário é muito importante, principalmente para a organização do registro, coleta de material biológico para os testes genéticos e acompanhamento através de tratamento multidisciplinar.⁴

Quando um paciente tem suspeita clínica de CCR hereditário, este deve ser orientado detalhadamente sobre sua doença. As decisões de conduta, tanto para a FAP como para o HNPCC, devem ser tomadas em conjunto com o paciente, que deve estar consciente do potencial de transmissão para os filhos, permitindo um planejamento familiar, e de acordo com todos os prós e contras dos métodos diagnósticos e terapêuticos propostos.

O teste genético deve ser muito bem esclarecido, principalmente com relação às suas limitações e sua confidencialidade, que deve ser absoluta, evitando-se assim estresse excessivo do paciente e possíveis problemas de discriminação das empresas de saúde ou de empregadores.

A coleta do material para estudo genético deve ser realizada preferencialmente em indivíduos maiores que 18 anos, com consentimento escrito informado e assinado pelo paciente ou responsável, onde devem estar relacionadas e explicadas

as condições em que o teste é realizado. Porém, existem relatos de testes realizados em menores de idade com consentimento dos pais, inclusive com ótimos resultados na esfera psicológica.²⁰

Nos Estados Unidos e Europa existem inúmeros serviços especializados no atendimento de famílias portadoras de tumores com caráter hereditário. Segundo relato do Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI), em 1995 existiam 41 centros de atendimento para famílias com tumores hereditários no país.⁴⁷

Alguns modelos de atendimento são propostos por diferentes autores. Lynch et al.⁴⁸ propõem um modelo de avaliação genética para câncer hereditário, que inclui um questionário, apoio clínico, reunião de família e educação da família. Outra proposta recomenda história familiar completa, exame físico, exames de laboratório, teste psicológico, orientação genética e psicológica, além de um programa de suporte a longo prazo.⁴⁹ Mulvihill⁵⁰ afirma que o cuidado com famílias portadoras de tumores hereditários deve ser total, com orientação genética formal desde o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dos pacientes, colocando os riscos da doença e sua transmissão para cada membro da família.

No Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, em São Paulo, contamos com um serviço multidisciplinar de atendimento a pacientes e famílias de portadores de CCR hereditários, incluindo cirurgião, clínico, geneticista, psiquiatra, assistente social e biólogo molecular. Atualmente estão registradas 35 famílias portadoras de CCR hereditário, atendidas com suporte global desde o diagnóstico clínico até o molecular, passando pela orientação genética e psicológica.

Um ponto de extrema importância para a oncologia em geral é a disseminação de informações sobre o assunto, tanto para os médicos, desde a formação acadêmica, como para a população. Somente através da educação da população e da formação adequada de novas gerações de médicos é que mais diagnósticos de adenomas, de CCR precoces e de famílias portadoras de tumores hereditários, não apenas colorretais, serão realizados, com encaminhamento, então, para instituições de atendimento terciário ou especializado, dando início ao processo do tratamento ainda em fase adequada, evitando-se assim óbitos pela doença.

ABSTRACT

About 15% of the colorectal tumors are hereditary. There are two main groups: the familial adenomatous polyposis (FAP) and the non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), both autosomal dominant diseases. Patients with FAP present hundreds to thousands of adenomas in colorectum, usually after puberty. The cause of FAP is mutation of the adenomatous polyposis coli (APC) gene, located on long arm of chromosome 5 (5q). Patients who have not undergone to colectomy, the only treatment available, will develop colorectal cancer and die at the age of 45 years. Extracolonic manifestations can occur: gastric and small bowel adenomas, soft tissue tumors, retinal pigmentation, osteomas. Patients with HNPCC do not present hundreds of benign polyps, but already a solitary colorectal cancer. This disease is caused by mutations in one of the several mismatch repair genes (hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, hPMS6/GTBP). The average age of the diagnosis is 45 years and

usually the disease produces cancer in the right colon. Other carcinomas can occur: endometrial, stomach, pancreas and others. Prophylactic surgery in asymptomatic gene carriers are controversial. Nowadays it is possible to identify asymptomatic genes carriers of FAP and HNPCC by genetic testing. The analysis can be done by direct gene sequencing or by in vitro synthesized protein assay (IVSP), which finds defective truncate proteins. Genetic testing for hereditary forms of colorectal cancer requires not only an appropriate laboratory, but genetic counseling with an ethical multidisciplinary approach considering the psychological and social consequences.

Key Words: Familial adenomatous polyposis; FAP; Adenoma; Hereditary non-polyposis colorectal cancer; HNPCC; Genetic tests.

REFERÊNCIAS

1. Fearon ER – Molecular abnormalities in colon and rectal cancer. In: Mendelsohn, Howley PM, Israel MA, Liotta LA – *The molecular basis of cancer*. Philadelphia W.B.Saunders, 1995. p.340-57.
2. Fearon ER, Vogelstein B – A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990;61:759-67.
3. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil 1996: Rio de Janeiro, Pro-Onco, 1996. p.19.
4. Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, et al – Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *South-American Journal of Cancer* 1997;1:191-7.
5. Menko FH – Familial and hereditary colorectal cancer. In: Menko FH (ed): *Genetics of colorectal cancer for clinical practice*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers, 1993, pp.58-112.
6. Distant S, Nasioulas S, Somers GR, et al – Familial adenomatous polyposis in a 5 year old child: a clinical, pathological, and molecular genetic study. *J Med Genet* 1996;33:157-60.
7. Bertoni G, Sassatelli R, Nigrisoli E, et al – High prevalence of adenomas and microadenomas of the duodenal papilla and periampullary region in patients with familial adenomatous polyposis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1996;8:1.201-6.
8. Valanzano R, Cama A, Volpe R, et al – Congenital hypertrophy of the retinal pigment epithelium in familial adenomatous polyposis. *Cancer* 1996;78:2.400-10.
9. Clark SK, Phillips RK – Desmoids in familial adenomatous polyposis. *Br J Surg* 1996;83:1.494-504.
10. Lynch HT, Fitzgibbons R Jr – Surgery, desmoid tumors, and adenomatous polyposis: case report and literature review. *Am J Gastroenterol* 1996;91:2.598-601.
11. Paraf F, Jothy S, Van Meir EG – Brain tumor-polyposis syndrome: two genetic diseases? *J Clin Oncol* 1997; 15: 2744-58.
12. Marchesa P, Fazio VW, Church JM, et al – Adrenal masses in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1997; 40: 1.023-8.
13. Civitelli S, Tanzini G, Cetta F, et al – Papillary thyroid carcinoma in three siblings with familial adenomatous polyposis. *Int J Colorectal Dis* 1996; 11: 34-7.
14. Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y, et al – Mutations of chromosome 5q21 in FAP and colorectal cancer patients. *Science* 1991; 253: 665-9.
15. Powell SM, Petersen GM, Krush AJ, et al – Molecular diagnosis of familial adenomatous polyposis. *N Engl J Med* 1993; 329: 1.982-7.
16. Knudson AG Jr – Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res* 1985; 45: 1437-43.
17. Powel SM, Zils N, Beazer-Barclay Y, et al – APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359:235-7.
18. Erisman MD, Scott JK, Astrin SM – Evidence that the FAP gene is involved in a subset of colon cancers with a completable defect in c-myc regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86: 4.264-8.
19. Roest PAM, Roberts RG, Sugino S, et al – Protein truncation test (PTT) for rapid detection of translation-terminating mutations. *Hum Mol Genet* 1993;10:1.719-21.
20. Giardiello FM – Genetic testing in hereditary colorectal cancer. *JAMA* 1997;278:1.278-81.
21. Giardiello FM, Petersen GM, Piantadosi S, et al – APC gene mutations and extraintestinal phenotype of familial adenomatous polyposis. *Gut* 1997;40:521-5.
22. Wu JS, Paul P, McGannon EA, et al – APC genotype, polyp number, and surgical options in familial adenomatous polyposis. *Ann Surg* 1998;227:57-62.
23. Milsom JW, Ludwig KA, Chuch JM, et al – Laparoscopic total abdominal colectomy with ileorectal anastomosis for familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1997;40:675-8.
24. Parks IG, Percy JP – Resection and sutured coloanal anastomosis for rectal carcinoma. *Br J Surg* 1982; 69:301-4.
25. Korsgen S, Keighley MR – Causes of failure and life expectancy of the ileal pouch. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:4-8.
26. Ziv Y, Church JM, Oakley JR, et al – Results after restorative proctocolectomy and ileal pouch-anal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis and coexisting colorectal cancer. *Br J Surg* 1996;83:1.578-80.
27. Richard CS, Berk T, Bapat BV, et al – Sulindac for periampullary polyps in FAP patients. *Int J Colorectal Dis* 1997;12:14-8.
28. Belchetz LA, Berk T, Bapat BV, et al – Changing causes of mortality in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996;39:384-7.
29. Lynch HT, Smyrk T – Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). An updated review. *Cancer* 1996;78:1.149-67.
30. Muto T, Bussey HJ, Morson BC – The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975;36:2.251-70.
31. Jass JR, Stewart SM, Stewart J, Lane MR – Hereditary non-polyposis colorectal cancer: morphologies, genes and mutations. *Mutat Res* 1994;290:125-33.

32. Jarvinen HJ, Mecklin JP, Sistonen P – Screening reduces colorectal cancer rate in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) families. *Gastroenterology* 1995;108:1405-11.
33. Fitzgibbons R, Lynch HT, Stanislav G, et al – Recognition and treatment of patients with hereditary non-polyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987;206:289-95.
34. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al – A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
35. Vieira RAC, Rossi BM, Lopes A, et al – Rastreamento do câncer color-retal. *Acta Oncol Bras* 1997;17:40-6.
36. Kuska B – New diagnostic criteria for HNPCC are on the way. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 11-2.
37. Ponz de Leon M, Percesepe A, Benatti P, et al – Familial and hereditary factors in colorectal cancer: a new classification of tumors of large bowel (meeting abstract). *Br J Cancer* 1996; 73: 22.
38. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T, et al – Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997;84:233-7.
39. Weber TK, Conlon W, Petrelli NJ, et al – Genomic DNA-based *hMSH2* and *hMLH1* mutation screening in 32 Eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees. *Cancer Res* 1997;57:3798-803.
40. Lynch HT – Is there a role for prophylactic total colectomy among hereditary nonpolyposis colorectal cancer germline mutation carriers? *Dis Colon Rectum* 1996;39:109-10.
41. Dunlop MG, Farrington SM, Carothers AD, et al – Cancer risk associated with germline DNA mismatch repair gene mutations. *Hum Mol Genet* 1997;6:105-10.
42. Senba S, Konishi F, Okamoto T, et al – Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* 1998;82:279-85.
43. Lukish JR, Muro K, DeNobile J, et al – Prognostic significance of DNA replication errors in young patients with colorectal cancer. *Ann Surg* 1998;227:51-56.
44. Rodrigues-Bigas MA, Vasen HF, Pekka-Mecklin J, et al – Rectal cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer after abdominal colectomy. International Collaborative Group on HNPCC. *Ann Surg* 1997;225:202-7.
45. Soravia C, Bapat B, Cohen Z – Familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary non polyposis colorectal cancer (HNPCC): a review of clinical, genetic and therapeutic aspects. *Schweiz Med Wochenschr* 1997;127:682-90.
46. Church JM, Fazio VW, Lavery IC, et al – Quality of life after prophylactic colectomy and ileorectal anastomosis in patients with familial adenomatous polyposis. *Dis Colon Rectum* 1996; 39:1404-8.
47. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, et al – Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancers Centers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1446-55.
48. Lynch HT, Fitzsimmons ML, Lynch J, Watson P – A hereditary cancer consultation clinic. *Nebr Med J* 1989;74:251-9.
49. Li FP, Garber JE, Friend SH, et al – Recommendations on predictive testing for germ line p53 mutations among cancer-prone individuals. *J Natl Cancer Inst* 1992;84:1156-60.
50. Mulvihill JJ – Genetic counseling of the cancer patient. In: DeVita VT Jr, Hellman S, Rosenberg SA, editors. *Cancer: principles and practice of oncology*. Vol 2, 4th ed., Philadelphia: Lippincott, 1993, p.2529-37.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Dr. Benedito Mauro Rossi
Hospital A. C. Camargo
Depto. Cirurgia Pélvica
Rua Prof. Antônio Prudente, 211
01509-010 – São Paulo – SP

ANEXO 3

Mutation and Polymorphism Report

Title : A novel germline mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred

Authors: Cassandra M. Corvello¹, Roberta A.U. Bevilacqua¹, Benedito M. Rossi², Andrew J.G. Simpson¹

Affiliations: ¹ Laboratory of Cancer Genetics, Ludwig Institute for Cancer Research and ²Department of Pelvic Surgery, A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, SP, Brazil

Species: Homo sapiens

Gene/Locus

Name: MutS homologue 2 (mismatch repair)

Symbol: MSH2
HUGO-approved when available

Genbank accession number: U03911

OMIM accession number: 120435

Locus specific database: GDB 203983
web address when available

Chromosomal location: 2p16
e.g., 12q24.1

Inheritance: germinal

Mutation / polymorphism name: 1249delG
To follow nomenclature guide.

Nucleotide change–Systematic name: c.1249delG
Sequential no. in genomic or cDNA sequence. *e.g., c1227c->T*

Amino acid change–Trivial name: 437X
Codon number and change. *e.g., R108W*

Mutation / polymorphism type: deletion of 1 bp, frameshift
Missense, deletion, splice, etc.

Polymorphism frequency: no, family sample
e.g., 40/60 C/T

Detection method: SSCP and sequencing
DGGE, etc.

Detection conditions

sequence of primers: MSH2-7F- 5' ttaattcaagttaattatttcag 3'
MSH2-7R- 5' tcactgttaccttcagttt 3'

PCR conditions: 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 1 min at 95°C, 1 min at 54°C and 1 min at 72°C, and a final extension step of 5 min at 72°C.

electrophoresis: The PCR products were denatured at 95°C for 5 min and loaded on a 6% non-denaturing polyacrylamide gel.

Diagnosis method developed: No
ASO, etc.

Evidence for existence and effect (mutation) or lack of effect (polymorphism):

	Yes	No	Don't know
1. Mutation found on repeat PCR sample	☒	☐	☐
2. Mutation segregates or appears with trait	☒	☐	☐
3. Mutation affects conserved residue	☐	☒	☐

4. Expression analysis supports hypothesis	☐	☐	☒
5. Mutation not found in 50 normal subjects	☐	☐	☒
6. Polymorphism	☐	☐	☒

Ancillary data

1. **Haplotype association :**
2. **Population association :**
3. **Geographic association :**
4. **Clinical phenotype of proband :** Colorectal cancer diagnosed at 40 years of age in a female with family history of HNPCC
5. **Homologous allele** (if recessive trait):
6. **Frequency:**
7. **PIC:**
8. **Ethnic background:** Caucasoid, Brazilian
9. **Other:**
10. **Present in HGMD listing:** Yes ☐ No ☒
(<http://www.cf.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>)

Comments

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome that has been associated with germline mutations in five DNA mismatch repair (MMR) genes: *MSH2*, *MLH1*, *PMS1*, *PMS2* and *MSH6* (Marra and Boland, 1995; Miyaki et al., 1997). Recently, a missense mutation was described in the TGF- β type II receptor (*TGFBR2*) gene in an HNPCC kindred without microsatellite instability (Lu et al., 1998). Here, we report a novel germline mutation in the *MSH2* gene in a member of a large Brazilian kindred that fulfil the Amsterdam criteria for HNPCC (Vasen et al., 1991) and with seven cases of colorectal cancer in two generations. The proband is a caucasian female with colorectal cancer diagnosed at 40 years of age and has two first-degree relatives (father and one brother) with colon cancer. The SSCP analysis of the exon 7 of the *MSH2* gene showed an extra single-stranded band present in the DNA sample from the affected individual. Direct sequencing of PCR products of exon 7 demonstrated a G deletion at codon 417 (1249delG) that results in a MSH2 protein truncated at position 437 (GenBank accession no. AF066081).

Acknowledgments

We thank Ricardo P. Moura for technical assistance and the family that participated in this study. CMC holds a Brazilian Research Council (CNPq) post-doctoral fellowship.

References

- Lu S-L, Kawabata M, Imamura T, Akiyama Y, Nomizu T, Miyazono K, Yuasa Y (1998) HNPCC associated with germline mutation in the TGF- β type II receptor gene. *Nature Genet* 19: 17-18.
- Marra G, Boland CR (1995) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 87: 1114-1125.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nature Genet* 17: 271-272.
- Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 34: 424-425.

Keywords

MSH2 gene, HNPCC, colorectal cancer, germline mutation

Corresponding Author Information (address, phone, fax, e-mail)

Cassandra M. Corvello, PhD
Ludwig Institute for Cancer Research
R. Prof. Antônio Prudente, 109 - 4 andar
São Paulo, SP, Brazil 01509-010

Tel: 55-11-270-4922 Fax: 55-11-270-7001 E-mail: corvel@uol.com.br

ANEXO 4

hMLH1 and *hMSH2* Gene Mutation in Brazilian Families With Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer

Benedito Mauro Rossi, MD, PhD, FACS, CSSO, Ademar Lopes, MD, PhD, FACS, FSSO, Fabio Oliveira Ferreira, MD, PhD, Wilson Toshihiko Nakagawa, MD, MS, Cláudia C. Napoli Ferreira, BS, José C. Casali da Rocha, MD, Catarina C. Simpson, BS, and Andrew J. G. Simpson, PhD

Background: The aim of this study was to search for mutations in the human *mutS* homolog 2 (*hMSH2*) and human *mutL* homolog 1 (*hMLH1*) genes in 25 unrelated Brazilian kindreds with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC).

Methods: The families were grouped according to the following clinical criteria: Amsterdam I or II; familial colorectal cancer (CRC); an early age of onset of CRC in the proband only; or with at least one or two relatives who had HNPCC-related cancers; CRC in the proband only. All patients were studied with direct sequencing.

Results: Ten mutations were detected (10 of 25 [40%]); of nine different mutations, seven were novel. The *hMLH1* gene had a higher mutation detection rate than *hMSH2* (8 of 25 [32%] vs. 2 of 25 [8%]). Only 3 of these 10 families fulfilled the Amsterdam criteria. Two different polymorphisms were detected in the *hMLH1* gene and four in the *hMSH2* gene.

Conclusions: The *hMLH1* gene had a higher mutation detection rate than *hMSH2*. The physician who deals with CRC must take into consideration the heredity issue with patients who present with an early age of onset or a familial history of CRC- or HNPCC-related cancers, including gastric cancer, even if they do not fulfill the former Amsterdam criteria.

Key Words: HNPCC—Lynch syndrome—Hereditary colorectal cancer—Mutation detection—*hMSH2*—*hMLH1*.

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), or Lynch syndrome, is an autosomal-dominant cancer syndrome with high penetrance (80% to 85%). It is characterized by an early age of onset of colorectal carcinomas (CRCs); proximal predominance of colon cancer; multiple synchronous or metachronous CRCs; and tendency to have multiple primary tumors, including endometrial carcinoma, small-bowel carcinoma, and

transitional-cell carcinoma of the ureter and the renal pelvis. Other less common extracolonic cancers can occur, such as carcinoma of the stomach and ovary and hepatobiliary carcinoma.^{1–6}

HNPCC is a common cancer predisposition syndrome and accounts for approximately 7% of all CRCs.⁷ However, Salovaara et al.⁸ have suggested that on the basis of a population study, this incidence should be lower (2%). The diagnosis is basically clinical, made by the characteristic family history. In 1991, the Amsterdam clinical criteria were proposed by the International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer⁹ in an attempt to provide uniformity in the clinical diagnosis of HNPCC in collaborative studies:

1. Three or more relatives with histologically verified CRC, one of whom is a first-degree relative of the other two.

2. CRC involving at least two successive generations.

Received June 18, 2001; accepted April 10, 2002.

From the Department of Pelvic Surgery (BMR, AL, FOF, WTN), the Hereditary Colorectal Cancer Registry (CCNF), the Department of Oncogenetics (JCCDR), and the Laboratory of Molecular Biology (CCS), the Hospital do Câncer A. C. Camargo, Fundação Antonio Prudente, São Paulo, Brazil; and the Laboratory of Cancer Genetics (AJGS), the Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo, Brazil.

Address correspondence and reprint requests to: Benedito Mauro Rossi, MD, PhD, Fundação Antonio Prudente, Hospital do Câncer A. C. Camargo, Departamento de Cirurgia Pélvica, Rua Prof. Antonio Prudente, 211, 01509-010, São Paulo, Brazil.

3. One or more CRC cases diagnosed before the age of 50 years.

4. Exclude familial adenomatous polyposis.

These were named Amsterdam criteria I. The International Collaborative Group former criteria were widely accepted; however, they were also criticized, mainly for excluding extracolonic cancers. In 1999, the same group proposed to add to the first criteria the following extracolonic tumors:

1. Adenocarcinoma of the endometrium.
2. Small-bowel carcinoma.
3. Transitional-cell carcinoma of the renal pelvis or ureter.

These were named Amsterdam criteria II. Adenocarcinomas of the stomach and ovary were excluded because of their low incidence.¹⁰

Occasionally, a family does not have a history of hereditary CRC, or a family history is not available. In such cases, if the proband has a suspect tumor presentation (right sided, young age, synchronous or metachronous CRC, or extracolonic tumors related to HNPCC), a *de novo* germ-line mutation should be considered.^{11,12}

The only known cause of HNPCC is the occurrence of an inherited mutation in one of the following mismatch-repair (MMR) genes: *hMSH2* (human *mutS* homolog 2), in chromosome band 2p16^{13,14}; *hMLH1* (human *mutL* homolog 1), in 3p21^{15,16}; *hPMS1* (human postmeiotic segregation 1), in 2q31 to 2q33¹⁷; *hPMS2* (human postmeiotic homolog 2), in 7p22¹⁷; and *hMSH6* (human *mutS* homolog 6; also known as *GTBP*), in 2p16, within .5 megabases of *hMSH2*.^{18,19} Among these genes, *hMSH2* and *hMLH1* account for the majority of mutations currently known in HNPCC families worldwide, reaching 90% in some series.²⁰ The involvement of the other DNA MMR genes is rare.²¹ However, some familial clusterings of CRC- and HNPCC-related tumors do not reveal mutations in these genes. A recent study suggested that germ-line mutations in the exonuclease 1 gene may be associated with atypical HNPCC families.²²

An important point to be considered is that most of the mutation analysis approaches are polymerase chain reaction (PCR) based and do not allow the detection of genomic deletions or gross rearrangements. Although the mutation spectrum at the MMR genes is mainly composed by single nucleotide insertions, deletions, or substitutions, there are as many as 32% missed exon deletions in *hMSH2* if Southern blot is not performed.²³

Microsatellite instability (MSI), the widespread and frequent mutation of short repetitive regions within the genome, occurs in 85% to 95% of HNPCC tumors.²⁴ Mainly since 1997, MSI and clinical phenotypes have been proposed to be used for the identification of poten-

tial HNPCC families, even when the Amsterdam criteria I or II are not fulfilled.^{12,25} The aim of this study was to identify mutations in *hMSH2* and *hMLH1* in 25 Brazilian kindreds with suspected HNPCC, by means of direct sequencing of the coding regions of the *hMLH1* and *hMSH2* genes.

METHODS

Patients

Twenty-five different Brazilian families with suspected hereditary CRC were consecutively enrolled from January 1995 to July 1999 at the Hospital do Câncer A. C. Camargo, Pelvic Surgery Department, and grouped according to the following criteria:

1. Five families that fulfilled the former Amsterdam criteria I or II.
2. One family that fulfilled the former Amsterdam criteria II.
3. Seven families were classified as having familial CRC without fulfilling Amsterdam criteria I or II. Although the Amsterdam criteria were not fulfilled, the patients had at least one relative with CRC or with an HNPCC-related cancer.
4. Eight families were included because the probands presented at an early age (<50 years), although they did not have affected relatives with CRC- or HNPCC-related cancers.
5. Three families were included because the probands presented at an early age (<50 years) and had at least one relative with CRC or with an HNPCC-related cancer, without fulfilling Amsterdam criteria I or II.
6. One family was included because the proband presented with rectal cancer, multiple metachronous colon adenomas, and renal cell carcinoma, without affected relatives.

All kindreds that did not fulfill the Amsterdam criteria had at least three generations studied and were huge, a common fact in Brazilian families. All families were registered at the Department of Pelvic Surgery Familial CRC Registry. Genetic counseling was given to all families. The study was approved by the Hospital Ethics Committee. Blood samples were drawn for genetic tests only after signed informed consent was obtained.

All patients were studied by PCR amplification and sequencing of the complete *hMSH2* and *hMLH1* MMR genes. MSI was not considered as a standard preliminary test in this study. Family enrollment began in 1995; however, only in 1998, after the Bethesda criteria,²⁶ were MSI tests indicated before sequencing for families suspected of having HNPCC.

Genetic Sequencing

DNA was obtained from peripheral blood leukocytes by phenol-chloroform extraction. PCR amplification of each exon of the *hMSH2* and *hMLH1* genes was undertaken and included all splice donor and acceptor sites (exon/intron boundaries). Sequences, reaction conditions, and specific primers are available from the authors on request.

The PCR products were directly sequenced on an ABI 377™ sequencer (Perkin Elmer/Applied Biosystems, Foster City, CA) by using Big Dye™ terminator chemistry on both strands with reagents obtained from Perkin Elmer/Applied Biosystems, according to the manufacturer's specifications.

RESULTS

Table 1 shows the main characteristics of each family, including age at diagnosis, sex, synchronous or metachronous tumors, family history, staging, and the sequencing results of the *hMLH1* and *hMSH2* MMR genes.

Ten mutations were detected among the 25 families examined, with a detection rate of 40%. Of nine different mutations, seven were novel. Families 7 and 8 presented the same missense mutation in *hMLH1*, exon 19, codon 718, with a change at nucleotide 2152 (C → T, His → Tyr). Two other novel missense mutations in *hMLH1* were found in families 1 and 4: exon 11, codon 338, with a change at nucleotide 1013 (A → G, Asn → Ser); and exon 16, codon 603, with a change at nucleotide 1808 (C → G, Pro → Arg), respectively. The missense mutation detected in family 5 has been previously described (Table 1). It consists of a change at nucleotide 1853 (A → C, Lys → Thr), codon 618, exon 16, also in the *hMLH1* gene. A novel nonsense mutation of the *hMLH1* was found in proband 6, who belonged to the only family that fulfilled the Amsterdam criteria II, in exon 18, codon 666, with a change at nucleotide 1998 (G → A, Trp → Stop; Fig. 1). Family 2 presented a novel in-frame mutation of the *hMLH1* gene, exon 13, codons 500 and 501 (deletion of TCA at nucleotides 1499–1501). Another new *hMLH1* mutation was found in intron 13, generating a splice defect (G → T at nucleotide 1558 + 1). Two new *hMSH2* protein-truncating mutations were found in families 9 and 10: exon 7, codon 417 (deletion of G at nucleotide 1249), causing a stop at codon 437; and exon 11, codon 556 (insertion of A at nucleotide 1667), resulting in a stop at codon 561, respectively. Both families fulfilled Amsterdam criteria I. The mutations found were distributed throughout the coding regions of the *hMLH1* and *hMSH2* genes.

The genetic characteristics of the CRC kindreds fulfilling the different criteria were analyzed, and some noteworthy points emerged. For example, among the 10 germ-line mutations (nine different) found in the 25 families, a higher frequency of mutations was detected in *hMSH1* than in *hMSH2* (8 of 25 [32%] vs. 2 of 25 [8%], respectively); among the 10 kindreds with germ-line mutations detected, only three (30%) fulfilled the Amsterdam criteria I or II. No mutations were detected in the *hMLH1* or *hMSH2* MMR genes in the other three families that fulfilled the Amsterdam criteria I. Furthermore, we found no significant difference between the mean age of the CRC diagnosis in the groups with and without detected mutations (45.7 vs. 46.5 years). Among the group with detected mutations, 50% of the probands were diagnosed with rectal cancer, all of them with an *hMLH1* mutation, and 50% were diagnosed with a right-sided colon tumor. Among the group without a detected mutation, the tumor was located in the rectum in six cases, in the left colon in five cases, and in the right colon in four cases.

Table 2 shows the polymorphisms identified. Two polymorphisms were detected in *hMLH1*; one of them was found in seven different probands (7 of 25 [28%]). Four different alterations were detected in *hMSH2* (frequency of 1 in 25 each).

DISCUSSION

In Brazil, in contrast to Europe, it is very difficult to determine the exact origin of individual families. There is heterogeneous racial miscegenation because of Portuguese Italian migration, as well as blacks from Africa and native Brazilian Indians. There are no previous studies of mutations of the *hMLH1* and *hMSH2* genes in Brazil. This work, therefore, represents the first record of such mutations in Brazilian patients with HNPCC.

Twenty-five unrelated families were studied, and germ-line mutations were detected in 10 cases (40%)—8 mutations were found in *hMLH1* (4 missense [1 in 2 distinct families], 1 in-frame, 1 splice defect [intron], and 1 nonsense) and two in *hMSH2* (2 frameshifts). Lynch et al.³³ identified germ-line mutations in *hMLH1* or *hMSH2* in 18 of 56 families (32.1%) clinically characterized as having HNPCC; this is slightly less than the proportion in this study. Pensotti et al.³⁴ identified germ-line mutations in *hMLH1* or *hMSH2* in 8 of 16 (50%) families of Italian descent with a clinical diagnosis of HNPCC.

Among the nine mutations detected in the 10 families in this study, two have been previously described (families 3 and 5): one by Han et al.²⁷ and the other in Italy (International Collaborative Group on Hereditary Non-

TABLE 1. *hMLH1 and hMSH2 mutations in Brazilian families with suspected HNPCC*

Patient No.	Proband			Family history	CRC staging, TNM (1997)	Mutation						Reference
	Age (y)/sex	CRC location	Other tumors			MMR gene	Exon	Codon	Nucleotide change	Consequence		
1	38/F	Rectum	No	Father: lymphoma Uncle: CRC	T3N2M0G1	hMLH1	11	338	A → G at nt 1013	Asn → Ser (missense)	New	
2	60/F	Right colon	No	Sister: breast 3 nephews: 2 gastric, 1 pancreas	Unknown	hMLH1	13	500/501	Del TCA at nt 1499–1501	In-frame	New	
3	42/F	Right colon Left colon	No	No	Villous T1N0M0G1 Villous T1N0M0G1	hMLH1	Intron 13	–	G → T at nt 1558 +1	Splice defect	Unpublished (ICG-HNPCC)	
4	70/M	Rectum	No	Sister: colon 2 nephews: gastric	T2N0M0G2	hMLH1	16	603	C → G at nt 1808	Pro → Arg (missense)	New	
5	42/F	Rectum	No	No	T2N0M0G2	hMLH1	16	618	A → C at nt 1853	Lys → Thr (missense)	27	
6	42/M	Right colon	No	Amsterdam II	Unknown	hMLH1	18	666	G → A at nt 1998	Trp → Stop (nonsense)	New	
7	27/M	Rectum	No	Adopted	Unknown	hMLH1	19	718	C → T at nt 2152	His → Tyr (missense)	New	
8	55/M	Rectum	No	Grandmother: colon at 45 y	T2N0M0G1	hMLH1	19	718	C → T at nt 2152	His → Tyr (missense)	New	
9	41/F	Right colon	No	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	hMSH2	7	417	Del G at nt 1249	Frameshift Stop at codon 437	28	
10	40/F	Right colon	Colon adenoma, bladder carcinoma	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	hMSH2	11	556	Ins A at nt 1667	Frameshift Stop at codon 561	New	
11	52/M	Rectum	Melanoma	Father: colon Sister: rectum Sister: ovary	T2N0M0G1	No						
12	42/M	Left colon	Multiple colon adenomas, skin adenomas	Amsterdam I	Mucous T3N0M0G1	No						
13	63/F	Left colon	No	Amsterdam I	T3N0M0G2	No						
14	55/F	Left colon	No	Uncle: colon Uncle: uterus ^a	T1N1M0G2	No						
15	45/M	Right colon	No	No	T4N0M0Gx	No						
16	65/M	Rectum	No	Amsterdam I	T3N1M0G2	No						
17	33/F	Rectum	No	One generation: 5 brothers: CRC 1 sister: uterus	T1N0M0G1	No						
18	36/M	Right colon	No	Mother: uterus ^a	T3N0M0Gx	No						
19	64/M	Rectum	No	Two first-degree: CRC	T1N0M0G1	No						
20	29/M	Right colon	No	No	T2N0M0G2	No						
21	28/M	Right colon	No	No	T3N0M0G2	No						
22	45/M	Rectum	No	Uncle: rectum	T4N0M0G2	No						
23	69/M	Rectum	Multiple colon adenomas, renal carcinoma	Unknown	T2N0M0G1	No						
24	18/F	Left colon	No	No	T3N0M0G2	No						
25	53/M	Left colon	No	Father: gastric Sister: uterus ^a	T3N0M1Gx (M: liver)	No						

HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; CRC, colorectal cancer; nt, nucleotide; ICG-HNPCC, International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer; Del, deletion; Ins, insertion; TNM, tumor-node-metastasis; MMR, mismatch repair.

^a Doubt: endometrium or cervix.

Polyposis Colorectal Cancer, unpublished data, date unavailable). However, we detected the remaining seven for the first time, although we already described the mutation found in family 9.²⁸ Although families 7 and 8 were unrelated, they presented the same missense alter-

ation (His → Tyr, at nucleotide 2152; *hMLH1*). Indeed, three of the new missense mutations (in families 1, 4, 7, and 8) should be studied in other family members to determine whether they segregate with cancer, because missense mutations cannot be distinguished with preci-

FIG. 1. Heredogram of an Amsterdam II family presenting a non-sense mutation in the *hMLH1* gene: exon 18, codon 666, G → A at nucleotide 1998 (Trp → Stop).

sion from rare polymorphisms. Furthermore, the frequency of occurrence must be evaluated in normal Brazilian individuals. The fourth missense mutation has been previously described by Han et al.²⁷

With regard to the proportion of mutations in *hMLH1* and *hMSH2*, Han et al.³⁵ reported similar results in Korean families. Of 13 mutations identified, only one was in *hMSH2*, whereas 12 were in *hMLH1*. Among Japanese families, however, Bai et al.¹² showed an inverse proportion, with a greater number of germ-line mutations in *hMSH2* than in *hMLH1* (11 vs. 1, respectively). All the families studied by Bai et al. fulfilled the Amsterdam criteria or the Japanese criteria, and mutations were found in 12 of 37 (32.4%)—close to the results of this study. Peltomäki and Vasen²⁴ also found a greater number of mutations in *hMLH1*, as well as a higher proportion of frameshift mutations in *hMSH2*. In this study, both mutations found in *hMSH2* resulted in protein truncation.

In the study described here, only 20% (5 of 25) of the families fulfilled the Amsterdam criteria I⁹; of these, 40% (2 of 5) showed germ-line mutations, both in *hMSH2* (families 9 and 10). Only family 6 was characterized as Amsterdam II,¹⁰ with a germ-line mutation found in *hMLH1* (nonsense). Seven of the 10 mutations (70%) found were in patients from families that did not fulfill the Amsterdam criteria I or II. These findings

indicate that physicians attending patients who have CRC should not restrict themselves to the Amsterdam criteria when considering a heredity diagnosis. However, we also insist on the clinical characteristics of HNPCC that follow the Amsterdam criteria I or II. Therefore, if there is risk of a hereditary diagnosis in a family, but the family does not fulfill the Amsterdam criteria, the physician must be cautious when diagnosing heredity clinically until the molecular confirmation of the syndrome through genetic tests to identify the specific germ-line mutation. In 1997, the Bethesda criteria²⁶ were published, not to represent a clinical diagnosis, but rather to indicate those individuals eligible for genetic testing (MSI) because of the risk of HNPCC.

Of the eight probands indicated for genetic testing because of early CRC only, three (37.5%) presented mutations in *hMLH1* or *hMSH2*, a result similar to what was obtained in patients of families that fulfilled the Amsterdam criteria I or II. Therefore, a young age at CRC diagnosis must alert the physician, mainly in small families or those difficult to characterize, that HNPCC is a possibility.³⁴ Our results did not show meaningful differences in the age of diagnosis between the group with detected germ-line mutations and that without (45.7 vs. 46.5 years). Fitzgibbons et al.³⁶ found that the mean age of the CRC diagnosis in patients with HNPCC was 45.6 years. We cannot rule out the possibility of de novo germ-line mutations—i.e., the first mutation occurrence within a family—which could explain isolated cases of CRC in young patients, with no previous occurrence in the family but with positive genetic tests. In such isolated cases with identified germ-line mutations, the same mutation should be searched for in the parents (if negative, de novo mutation is confirmed) and in the family members for the diagnosis of carriers.

Of three probands with early CRC, but without a typical HNPCC family history, mutations were found in one (33.3%), which reinforces the possibility of heredity in cases of early CRC. Likewise, of seven probands whose family background did not fulfill the Amsterdam

TABLE 2. *hMLH1* and *hMSH2* polymorphisms in Brazilian families with suspected HNPCC

Exon	Gene	Nucleotide change	Frequency	Reference
<i>hMLH1</i>				
8	Codon 219	ATC → GTC at 655	7/25 (28%)	29, 30
Intron 13	+14 of 3' exon 13	G → A at 1558 +14	1/25	30
<i>hMSH2</i>				
2	Codon 113	AAG → AAA at 339 (Lys → Lys)	1/25	31
5	Codon 273	GTA → GTG at 819 (Val → Val)	1/25	New
Intron 1	+8 of 3' exon 1	G → C at 211 +8	1/25	New
Intron 9	-9 of 5' exon 10	T → A at 1511 -9	1/25	32

HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer.

criteria and whose CRC diagnosis was after 50 years of age, three (42.9%) showed mutations in *hMLH1* or *hMSH2*. Even in these situations, HNPCC should be taken into consideration.

Although the diagnosis of gastric cancer is not in the Amsterdam criteria, it is part of the syndrome. Of the 10 families that had germ-line mutations, two (20%) presented with individuals with gastric tumors. One family presented with an in-frame-type deletion, and the other presented with a missense mutation.

Rectal cancer was diagnosed in 5 of 10 probands (50%) who had germ-line mutations, all of them in *hMLH1* (5 of 8 [62.5%] of the *hMLH1* mutations). There is no precedent for this finding in the literature, so it could be a population feature, to be confirmed through gene segregation with the rectal tumor in the other members of the families that have this disease. The other five patients with detected germ-line mutations presented with right-sided colon tumors (5 of 10 [50%]).

Of 10 patients with germ-line mutations, six presented with CRC stage I or II (T1–3N0M0), and only one presented with stage III (N1–2).³⁷ In three cases, staging could not be defined because of previous surgeries. Early CRC stage could be associated with HNPCC and carries the better prognosis.

One way of screening CRC patients who might have HNPCC is to research the MSI in the tumor tissue,³⁸ on the basis of the Bethesda criteria.²⁶ Most cases of CRC with germ-line mutations present MSI (85% to 95%).²⁵ However, MSI also occurs in patients who have sporadic CRC. Nevertheless, the use of simple approaches, such as testing for mutations, in patients who have suspected HNPCC (e.g., MSI-BAT 26) is clearly now indicated as a standard procedure. Patients with MSI should be considered as candidates for mutation detection. If a patient with CRC belongs to a typical HNPCC family according to the Amsterdam criteria, the sequencing of *hMLH1* and *hMSH2* should be considered as a first option for the molecular diagnosis. In those cases, when *hMLH1* and *hMSH2* are normal, mutation research into *hMSH6* (also called *GTBP*) must be taken into consideration.²⁰ Some mutations in *hMSH6* are related to cancer accumulation (CRC, gastric, endometrial, and pancreatic).^{39–41}

The polymorphism Ile → Val, exon 8, codon 219 of *hMLH1* is reported with a frequency of 13% to 34%.^{29,30} We found 28% (7 of 25) of our samples with this alteration, showing that it is common in Brazilian families. A polymorphism in *hMSH1* intron 13 was previously described by Tannergard et al.,³⁰ but we require a population study to define its frequency in Brazil. In the *hMSH2* gene, four polymorphisms were found—1 described by Borresen et al.,³² another by Liu et al.,³¹ and

two new ones—each showing an incidence of 1 in 25 in our samples.

Genetic tests are only one part of the process of our management of patients and families with hereditary CRC. After clinical suspicion of hereditary CRC, the patient is questioned as to a detailed family history, preferably together with other older family members, who may provide supplementary information about distant members of the family or about those who may have already died. As many data as possible are collected, including names, dates of birth and death, causes of death, associated diseases, and surgeries. In this first consultation, the pedigree background is established and recorded in the Institutional Data Bank. After this consultation, genetic testing consisting of MSI or the sequencing of *hMLH1* and *hMSH2* can be indicated after written, informed consent. After the results of the tests are released, they are handed to the patient confidentially, and a process of family orientation, clinical attendance, and psychological support is provided. Lynch et al.³³ and other authors^{42,43} propose similar support for these families. It is important to call to attention that the risk of cancer predisposition is based on clinical data and family history, and the absence of a mutation detected in a family clinically featured as HNPCC by the Amsterdam criteria does not reduce or eliminate the risk of having the disease. However, the germ-line mutation detection helps the support of the carriers.

In summary, we found a greater prevalence of germ-line mutations detected in the *hMLH1* gene than in *hMSH2* in Brazilian families. In addition to the Amsterdam criteria I and II, which define the clinical diagnosis of HNPCC, the physician in Brazil should also consider HNPCC when a patient is young and has CRC or when a patient has CRC and a family history of HNPCC, even if it is nontypical, with specific attention being given to gastric tumors.

Acknowledgments: Supported by the Federal Research Council and the São Paulo State Research Foundation.

REFERENCES

1. Lynch HT, Watson P, Lanspa SJ, et al. Natural history of colorectal cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). *Dis Colon Rectum* 1988;31:439–44.
2. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an updated review. *Cancer* 1996;78:1149–67.
3. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: the syndrome, the genes, and historical perspectives (review). *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114–25.
4. Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Lahti MN, Järvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995;64:430–3.

5. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992;33:783-6.
6. Tomoda H, Baba H, Oshiro T. Clinical manifestations in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Surg Oncol* 1996;61:262-6.
7. Rossi BM, Corvello CM, Anelli A, et al. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *S Am J Cancer* 1997;1:191-7.
8. Salovaara R, Loukola A, Kristo P, et al. Population-based detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000;18:2193-200.
9. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991;34:424-5.
10. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999;116:1453-6.
11. Rossi BM, Pinho MSL, Nakagawa WT, Johnson LFP, Lopes A. Hereditary colorectal tumors. *Rev Col Bras Cir* 1998;25:271-80.
12. Bai YQ, Akiyama Y, Nagasaki H, et al. Predominant germ-line mutation of the hMSH2 and hMLH1 gene in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. *Int J Cancer* 1999;82:512-5.
13. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-38.
14. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-25.
15. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-61.
16. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-9.
17. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
18. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 1994;268:1909-12.
19. Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. *Science* 1995;268:1912-4.
20. Planck M, Koul A, Fernebro E, et al. hMLH1, hMSH2 and hMSH6 mutations in hereditary non-polyposis colorectal cancer families from southern Sweden. *Int J Cancer* 1999;83:197-202.
21. Lu SL, Kawabata M, Imamura T, et al. HNPCC associated with germline mutations in the TGF- β type II receptor gene. *Nat Genet* 1998;19:17-9.
22. Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, et al. MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 1998;20:326-8.
23. Wu Y, Berends MJW, Post JG, et al. Germline mutations of EXO1 gene in patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and atypical HNPCC forms. *Gastroenterology* 2001;120:1580-7.
24. Peltomäki P, Vasen HFA. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997;113:1146-58.
25. Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, et al. Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 1998;338:1481-7.
26. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758-62.
27. Han HJ, Maruyama M, Baba S, Park JG, Nakamura Y. Genomic structure of human mismatch repair gene hMLH1, and its mutation analysis in patients with hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). *Hum Mol Genet* 1995;4:237-42.
28. Corvello CM, Bevilacqua RAU, Rossi BM, Simpson AJG. A novel mutation at exon 7 of the MSH2 gene (1249delG) in a large HNPCC Brazilian kindred. *Hum Mutat* 1999;13:506-8.
29. Liu B, Nicolaides NC, Markowitz S, et al. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;9:48-55.
30. Tannergard P, Lipford JR, Kolodner R, Frodin JE, Nordenskjold M, Lindblom A. Mutation screening in the hMLH1 gene in Swedish hereditary nonpolyposis colon cancer families. *Cancer Res* 1995;55:6092-6.
31. Liu T, Wahlberg S, Rubio C, Holmberg E, Gronberg H, Lindblom A. DGGE screening of mutations in mismatch repair genes (hMLH1 and hMSH2) in 34 Swedish families with colorectal cancer. *Clin Genet* 1998;53:131-5.
32. Borresen AL, Lothe RA, Meling GI, et al. Somatic mutations in the hMSH2 gene in microsatellite unstable colorectal carcinomas. *Hum Mol Genet* 1995;4:2065-72.
33. Lynch HT, Watson P, Shaw TG, et al. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer. Part I: studies of cancer families. *Cancer* 1999;86:1629-36.
34. Pensotti V, Radice P, Presciutti S, et al. Mean age of tumor onset in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) families correlates with the presence of mutations in mismatch repair genes. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;19:135-42.
35. Han HJ, Yuan Y, Ku JL, et al. Germ-line mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1317-9.
36. Fitzgibbons RJ, Lynch HT, Stanislav GV, et al. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987;206:289-95.
37. Sobin LH, ed. Classificação dos tumores malignos (TNM). 5th ed. Rio de Janeiro: Coordenação de Programas de Controle do Câncer, 1998:72-5.
38. de la Chapelle A. Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genet* 1999;7:407-8.
39. Akiyama Y, Sato H, Yamada T, et al. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997;57:3920-3.
40. Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, et al. Germ-line mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 1997;17:271-2.
41. Shin KH, Ku JL, Park JG. Germ-line mutations in a polycytosine repeat of the hMSH6 gene in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Hum Genet* 1999;44:18-21.
42. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, et al. Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute cancer centers. *J Nat Cancer Inst* 1995;87:1446-55.
43. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. *JAMA* 1997;277:915-9.

ANEXO 5

CÂNCER COLORRETAL HEREDITÁRIO SEM POLIPOSE – HNPCC

Hereditary non-polyposis colorectal cancer – HNPCC

BENEDITO MAURO ROSSI, TCBC, FACS, CSSO¹, FÁBIO DE O. FERREIRA, TCBC¹
WILSON T. NAKAGAWA¹, SAMUEL AGUIAR JR.¹, JOSÉ CLÁUDIO C. ROCHA²
ADEMAR LOPES, TCBC, FACS, FSSO¹

Resumo

Os autores apresentam revisão da literatura sobre câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC). São apresentados os critérios para diagnóstico clínico (Critérios de Amsterdam I e II) e os critérios para suspeita clínica de HNPCC (Critérios de Bethesda). As indicações dos testes de instabilidade de microsatélite (MSI), de metilação do gene hMLH1 e de sequenciamento dos genes de reparo hMLH1 e hMSH2 são discutidas. Além disso, também são apresentadas as opções de tratamento cirúrgico para pacientes com câncer em famílias de HNPCC e a conduta adequada para seu seguimento, incluindo aconselhamento de risco e exames complementares, visando orientação da família e o diagnóstico precoce de possíveis tumores relacionados à síndrome.

Unitermos: HNPCC. Síndrome de Lynch, Câncer colorretal hereditário sem polipose. Detecção de mutações. Genes de reparo. Instabilidade de microsatélites.

Keywords: HNPCC. Lynch Syndrome. Hereditary non-polyposis colorectal cancer. Mutation detection. Mismatch repair genes. Microsatellite instability.

Incidência

O câncer colorretal (CCR) é o sexto em incidência no Brasil. Se considerarmos apenas a região Sudeste, é o segundo mais frequente no homem, atrás do câncer de próstata, e o terceiro na mulher, atrás do câncer de mama e do colo de útero. Se não considerarmos o sexo, o CCR é o segundo mais incidente na região Sudeste, atrás apenas do câncer de mama, com estimativa de 9.400 casos novos por ano.¹ Nos Estados Unidos a estimativa é de 130.200 novos casos anuais de CCR.

Não existem dados sobre a incidência de câncer colorretal hereditário sem polipose (HNPCC) no Brasil. Porém, se considerarmos a literatura internacional, esse número está entre 3% e 12% de todos os casos de CCR.^{3,4} Assim, se usarmos um valor médio de 8%, teremos cerca de 752 novos casos de CCR por ano no Brasil pertencentes às famílias de HNPCC. Nos Estados Unidos esse número chega a 10.416. Portanto, trata-se de um problema real e que precisa ser estudado, principalmente quando se considera uma população como a brasileira e suas características genéticas peculiares, com influências africanas, indígenas e européias.

Artigo de Revisão

Hospital do Câncer A.C. Camargo – São Paulo

1 - Departamento de Cirurgia Pélvica

2 - Departamento de Oncogenética

Endereço para correspondência: Dr. Benedito Mauro Rossi
Departamento de Cirurgia Pélvica. Hospital do Câncer A.C. Camargo.
Rua Prof. Antonio Prudente, 211. Cep 01509-010 – São Paulo-SP

Histórico

O conhecimento das bases genéticas do HNPCC teve um desenvolvimento muito grande nos últimos 10 anos. Hoje sabemos que é uma doença hereditária autossômica dominante, causada por mutação germinativa, em um dos genes responsáveis pelo reparo do DNA, durante a divisão celular. Se uma segunda mutação somática ocorrer no alelo normal correspondente ao defeito herdado, a célula afetada poderá acumular novas mutações rapidamente, aumentando a chance de aparecimento de câncer.³

Alfred Warthin, em 1895, observou uma família que chamou de "G", onde havia uma alta incidência de câncer gástrico, de endométrio e colorretal.⁵ Ele estava diante de uma família hoje clinicamente caracterizada como HNPCC. Porém, somente na década de 1960, com a descrição de duas grandes famílias caracterizadas como portadoras de "Síndrome do Câncer Familiar", é que se valorizou a descrição de Warthin, feita quase 70 anos antes.⁶ Vários relatos de famílias com características semelhantes foram então feitos na literatura internacional. Porém, foi um grupo finlandês, com seu registro de CCR muito bem organizado, que demonstrou que a síndrome, agora chamada internacionalmente de HNPCC, por alguns autores chamada de Síndrome de Lynch, não era rara em seu país.⁷ Esse fato demonstra a importância da organização do registro e da coleta de dados referentes a pacientes com câncer. Hoje, vários grupos colaborativos e instituições em todo o mundo dedicam-se ao estudo do HNPCC.

Os genes, as proteínas e suas funções

O HNPCC é causado pela ocorrência de uma mutação germinativa transmitida de forma autossômica dominante em um dos genes de reparo do DNA: hMSH2 (human mutS homolog 2), no cromossomo 2p16; hMLH1 (human mutL homolog 1), no 3p21; hPMS1 (human postmeiotic segregation 1), no 2q31-33; hPMS2 (human postmeiotic segregation 2), no 7p22; hMSH6/GTBP (human mutS homolog 6), no 2p16, há 0.5 megabase do hMSH2.⁸⁻¹⁴ Mais recentemente, relatos de novos genes de reparo envolvidos têm sido descritos, como o hMLH3 e o hMSH3.^{15,16}

Os genes de reparo agem como controladores de qualidade, mantendo a fidelidade do DNA na divisão celular, por meio de mecanismos que identificam, retiram e corrigem os erros nas seqüências de bases. Esses erros podem ocorrer por pareamento errado entre as bases ou por falha da enzima DNA polimerase, causando alças de inserção/deleção de bases (IDLs). As IDLs ocorrem por deslizamento errôneo da enzima na fita molde de DNA, geralmente em pequenas seqüências repetitivas de bases, como, por exemplo, os microssatélites. Por isso, cerca de 90% dos pacientes com CCR em famílias de HNPCC apresentam instabilidade de microssatélites (MSI), ou seja, alterações genéticas nessas seqüências repetitivas, em seus tumores.¹⁷⁻¹⁹

Dois grupos principais de proteínas estão envolvidos no processo de reparo em humanos: mutSh e mutLh. O modelo postulado para a

correção dos erros consiste de três passos básicos: reconhecimento do erro e formação do reparossomo, degradação da fita de DNA contendo o erro, e finalmente, realização do reparo. Um primeiro heterodímero chamado de hMutSa, formado por proteínas do grupo de homólogos de mutS (MSH), hMSH2 e hMSH6, tem sua ação principalmente nos erros de pareamento entre as bases. Um segundo heterodímero chamado de hMutSb, formado por hMSH2 e hMSH3, também pode iniciar o processo; porém, com ação principalmente nas IDLs. Por isso, os mecanismos de ação desses dois heterodímeros são complementares.²⁰ O passo seguinte nesse processo é desempenhado pela atividade da enzima ATPase, codificada na metade carboxi-terminal dos homólogos mutS.²¹ O ganho de um fosfato (ADP > ATP) no heterodímero hMutSa causa uma mudança conformacional no mesmo, transformando-o em uma espécie de braçadeira que corre sobre a dupla fita de DNA a ser reparada ("sliding clamp") desempenhando assim sua função.²²⁻²⁴ A proteína hMSH6 parece ter papel fundamental nessa fase, que ainda não é bem conhecida. Outras proteínas parecem também ser parte do processo nessa fase, como as provenientes dos homólogos mutL (MLH) e dos PMS (postmeiotic segregation), além dos antígenos nucleares de proliferação celular (PCNA) RPA e RFC, e das exo/endonucleases EXO1 e FEN1.^{20,25} Outro heterodímero chamado hMutLa, formado pelas proteínas hMLH1 e hPMS2, também parece estar envolvido com o mecanismo de reparo, assim como o hMutLb (proteínas hMLH1 e hPMS1); porém, ainda com mecanismos de ação pouco esclarecidos em humanos.^{16,26} Caso os mecanismos de reparo não sejam suficientes para corrigir os erros de replicação do DNA, a maquinaria de apoptose é ativada, levando a célula à morte.²⁷

A perda do mecanismo de reparo em indivíduos com uma mutação germinativa herdada, ou seja, com um alelo defeituoso, ocorre quando o alelo normal ou selvagem também perde sua função por perda de heterozigose (LOH).^{11,28} Processo semelhante ocorre com os genes supressores de tumor. Células sem o mecanismo de reparo funcionando têm uma probabilidade cerca de 1000 vezes maior de acumular mutações, acelerando, conseqüentemente, o processo de múltiplos passos da carcinogênese.^{29,30}

Muitas vezes é difícil diferenciar uma mutação com potencial patogênico de um polimorfismo, ou seja, uma variação individual sem efeito fenotípico deletério. Para melhor entendermos essa diferenciação, alguns conceitos devem ser explicitados. Quando a mutação no DNA é do tipo "frameshift", ou seja, existe uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos na fita de DNA, existe uma mudança da fase de leitura dos códons localizados após a alteração, causando mudança dos aminoácidos na tradução do RNA mensageiro, e geralmente uma parada, codificada por códon específico, com produção de uma proteína menor que o tamanho original, chamada de proteína truncada. No caso da simples troca de um nucleotídeo, podemos ter duas possibilidades. A primeira é que essa troca resulte em um códon específico para a parada da tradução do RNA mensageiro, causando também uma proteína truncada, de tamanho menor. Essa mutação é chamada de "nonsense". A segunda

possibilidade é de que a simples troca de um nucleotídeo cause apenas a mudança de um aminoácido por outro, não alterando o restante da codificação da proteína e formando conseqüentemente uma proteína de tamanho normal. Essa mutação é chamada de "missense".³¹

Quando detectamos uma mutação tipo "frameshift" ou "nonsense" nos genes de reparo em uma família com HNPCC, a chance de elas serem patogênicas, causadoras de alterações fenotípicas predisponentes ao câncer, é muito grande, pois a proteína codificada é truncada e muito alterada. Já no caso das mutações "missense", a proteína tem o tamanho normal, com a troca de um único aminoácido, podendo não haver alteração de sua função. Por isso, nessa situação, pode ser difícil diferenciar entre uma mutação patogênica e um polimorfismo.

Nesses casos, o mais indicado é correlacionar portadores da alteração "missense" detectada com o diagnóstico de câncer dentro da família em questão. Assim, saberemos se existe ou não o potencial patogênico da mutação em estudo.

Outra possibilidade de diferenciação é realizar testes de biologia molecular em laboratório. Entre esses testes, temos o que se baseia na superexpressão da proteína humana no reparo de DNA em leveduras normais. Proteínas humanas normais e variantes não patogênicas interferem com o sistema de reparo da levedura, causando um fenótipo alterado, enquanto mutações patogênicas humanas não interferem com o sistema de reparo.^{32,33} Outro teste também usa a levedura, mas, nesse caso, os genes humanos em estudo são introduzidos nas respectivas posições do *S. cerevisiae* e verifica-se o fenótipo produzido. A limitação desse método é que apenas genes conservados entre a levedura e o homem podem ser testados.^{34,35}

Um terceiro teste analisa o heterodímero hMutLa expresso em vírus, confirmando mutação em hMLH1 quando há alteração da interação com hPMS2. Algumas mutações em hMLH1 também podem alterar sua interação com o heterodímero hMutSa, o que causa um sistema de reparo não funcionante *in vitro*.¹⁵

Um último teste estuda proteínas hMSH2 e hMLH1 traduzidas *in vitro* e suas interações. Mutações em hMSH2 não alteram sua interação com hMSH6 e hMSH3, sugerindo que outras funções, como a atividade da enzima ATPase, foram alteradas. Mutações amino-terminais em hMLH1 têm comportamento semelhante, mas mutações carboxi-terminais causam perda de interação com hPMS2.^{36,37}

Aspectos clínicos e diagnóstico

O diagnóstico do HNPCC é clínico. Por isso, os médicos que lidam com pacientes portadores de CCR e tumores relacionados ao HNPCC devem conhecer as características clínicas da doença.

As principais características do HNPCC são.^{3,38}

- >Diagnóstico de câncer em idade precoce, em torno dos 47 anos de idade;
- >CCR com predominância pelo lado direito do cólon, em torno de 70% dos casos;
- >Associação com CCR metacrônico, em torno de 45% em 10 anos, se houver cólon remanescente após a primeira cirurgia;

>Associação com tumores extracolônicos, incluindo adenocarcinoma de endométrio, intestino delgado, estômago e ovário, e, carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais.

Além das características clínicas descritas, alguns achados anatomopatológicos do CCR em HNPCC são comuns, tais como: células em anel de sinete, componente mucinoso e predomínio de lesões indiferenciadas.

Em 1991, com a intenção de padronização internacional do diagnóstico clínico de HNPCC, o Grupo Colaborativo Internacional (ICG/HNPCC) publicou os chamados Critérios de Amsterdam, que consistem dos seguintes tópicos:³⁹

- >Pelo menos 3 membros de uma mesma família com CCR;
- >Um dos membros parente em primeiro grau dos outros 2;
- >Pelo menos 2 gerações acometidas;
- >Pelo menos 1 dos membros com CCR e idade menor que 50 anos;
- >Exclusão de polipose adenomatosa familiar.

Os Critérios de Amsterdam tiveram aceitação internacional e são de extrema valia para a padronização do diagnóstico clínico de HNPCC. Porém, também foram criticados pela exclusão dos tumores extracolônicos. Por isso, em 1999, o mesmo ICG/HNPCC publicou novos critérios para o diagnóstico clínico do HNPCC, acrescentando aos critérios de 1991, a possibilidade dos seguintes tumores, além do CCR:⁴⁰

- >Adenocarcinoma de endométrio;
- >Adenocarcinoma de intestino delgado;
- >Carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais (pelve renal e ureter).

Tumores de estômago e ovário não foram incluídos, segundo os autores, por sua baixa incidência dentro da síndrome. É interessante notar que não há menção sobre a necessidade do diagnóstico de CCR dentro de uma família para o diagnóstico do HNPCC, bastando o preenchimento dos Critérios de Amsterdam com tumores extracolônicos.

Claro que o espectro de diagnóstico do HNPCC foi ampliado com os novos Critérios de Amsterdam; porém, ainda existem algumas críticas, sendo a principal delas relativa à dificuldade de diagnóstico clínico principalmente em famílias pequenas, com poucos descendentes, fato comum na Europa, por exemplo. Nesses casos, para o diagnóstico clínico ser realizado, teríamos que esperar muito tempo, retardando portanto a orientação e o acompanhamento familiar.

Dentro desse enfoque, o Instituto Nacional de Câncer dos Estados Unidos (NCI) já havia publicado em 1997 os Critérios de Bethesda, não com o intuito de caracterizar o diagnóstico clínico de HNPCC, mas sim de indicar a pesquisa molecular da síndrome, por meio de MSI, em pacientes com suspeita de pertencerem à famílias de HNPCC.⁴¹ A pesquisa de MSI serve como um teste de rastreamento, para posterior seqüenciamento dos principais genes de reparo (MMR) nas famílias onde estiver presente, pois a instabilidade, como já vimos, ocorre na grande maioria dos casos de HNPCC. Os Critérios de Bethesda, para indicação de pesquisa de MSI, apoiam-se basicamente nos seguintes pontos, além dos Critérios de Amsterdam:

>Pacientes portadores de CCR e com 1 tumor extracolônico relacionado ao HNPCC, e idade menor que 45 anos, ou com adenomas colorretais, e idade menor que 40 anos;

>Pacientes com CCR e idade menor que 45 anos, com atenção para os tumores indiferenciados ou com células em anel de sinete;

>Pacientes com adenocarcinoma de endométrio e idade menor que 45 anos;

>Pacientes com adenomas colorretais, antes dos 40 anos de idade.

Diante das possibilidades criadas pelos Critérios de Bethesda, mais uma vez fica reforçada a proposta da disseminação desses conhecimentos entre todos os médicos que tratam pacientes com CCR ou tumores extracolônicos relacionados ao HNPCC, uma vez que a suspeita clínica de estarmos diante de um paciente pertencente à uma família com HNPCC vem de um interrogatório familiar bem feito e detalhado e do conhecimento das características da síndrome.

Apesar de os pacientes com HNPCC não apresentarem um quadro típico de múltiplos pólipos adenomatosos no cólon precedendo o aparecimento do câncer, como na polipose adenomatosa familiar, essas lesões representam a principal causa precursora do CCR nessas famílias. Existem descrições na literatura de pacientes que apresentaram evolução rápida e agressiva para CCR, a partir de pólipos adenomatosos.^{42,43} Um estudo realizado na Finlândia comparou a incidência de CCR e as taxas de óbito, analisando 2 grupos de pacientes com HNPCC, o primeiro submetido a colonoscopias regularmente, e o segundo formado por pacientes que se recusavam a realizar o exame. Ficou demonstrado que 1 CCR foi prevenido para cada 2,8 pólipos ressecados em pacientes com HNPCC.⁴⁴ Na população em geral, 1 CCR é prevenido para cada 41 a 119 polipectomias realizadas.⁴⁵

A Síndrome de Muir-Torre, descrita em meados da década de 1960, é caracterizada pela associação de lesões cutâneas à tumores relacionados hoje ao HNPCC.^{46,47} Essas lesões cutâneas são geralmente adenomas sebáceos, carcinomas sebáceos ou queratoacantomas. Hoje, sabemos que essas lesões, apesar de raras, podem fazer parte do HNPCC, sendo causadas também por falha dos genes de reparo.⁴⁸

Diagnóstico diferencial e sobrevida

Uma das maiores dificuldades no diagnóstico dos pacientes com CCR e HNPCC é a diferenciação com os casos esporádicos de CCR. Às vezes, é muito difícil estabelecermos a correlação com a hereditariedade, mesmo usando todos os critérios já expostos. Além disso, existe a possibilidade, ainda não bem estabelecida quantitativamente na literatura, de estarmos diante de um caso com uma mutação "de novo", ou seja, a primeira mutação germinativa dentro de uma família.

Outro diagnóstico, que as vezes pode dificultar a diferenciação com o HNPCC, é o da polipose adenomatosa familiar atenuada (AFAP). Nesses casos, podem ocorrer poucos pólipos no cólon, e, além disso, o tipo de herança é o mesmo: autossômica dominante. Nessas situações, os testes genéticos podem redimir a dúvida. O

seqüenciamento pode evidenciar mutações no início do gene APC, característica da AFAP.^{49,50}

Com relação à melhor sobrevida de pacientes com tumores ligados ao HNPCC, não existe uma explicação plausível na literatura. Talvez seja consequência da baixa incidência de metástases em pacientes com a síndrome ou do acompanhamento mais rigoroso desses indivíduos, pelo conhecido risco elevado de aparecimento de câncer. Porém, a causa desses achados ainda é desconhecida.⁵¹ Apesar disso, vários autores demonstraram o fato, como por exemplo, o mesmo estudo já citado anteriormente, que concluiu que pacientes portadores de CCR e HNPCC têm sobrevida de 65% em 5 anos, contra 44% para aqueles com CCR esporádico.⁴⁴

Indicação de testes genéticos, orientação e acompanhamento de famílias com HNPCC

A indicação de testes moleculares deve seguir padrões bem definidos e objetivos. O estabelecimento dessas indicações facilita o diagnóstico, diminui a ansiedade do paciente, da família e da equipe multiprofissional.

Podemos dividir os pacientes com CCR em três grupos, no que concerne à hereditariedade:

>Tumores esporádicos, ou seja, sem características suspeitas de hereditariedade;

>Tumores hereditários, ou seja, aqueles que preenchem os Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico;

>Tumores com suspeita de hereditariedade, seguindo os Critérios de Bethesda.

Pacientes com CCR esporádico devem ter o acompanhamento pós-operatório já bem estabelecido, sem a preocupação com os exames nos membros da família, mas, em cada retorno, o médico deve sempre questionar sobre novas informações referentes aos antecedentes familiares. Lembrar sempre que a idade precoce do aparecimento do CCR pode ser um fator de risco para HNPCC.

Pacientes com diagnóstico suspeito de hereditariedade, segundo os Critérios de Bethesda, têm indicação de pesquisa de MSI em tecido tumoral como primeira opção. Existem algumas controvérsias na literatura, mas parece que não é necessária a realização de um painel de diferentes microssatélites para o diagnóstico de instabilidade. Trabalhos recentes demonstram uma boa acurácia do diagnóstico feito apenas com a realização da pesquisa de instabilidade de um único microssatélite, chamado BAT26.⁵² No caso da instabilidade mostrar-se presente, está indicada a realização do seqüenciamento dos genes de reparo hMLH1 e hMSH2, responsáveis até por 60% e 35%, respectivamente, das causas de HNPCC.^{15,53} KOLODNER et al. e WIJNEN et al, analisando 58 e 278 famílias com HNPCC, referem que os dois genes somados, hMLH1 ou hMSH2, são causadores da doença entre 40% e 55% das vezes.^{54,55} Esses números têm uma variabilidade na literatura, mas aceita-se internacionalmente esses dois genes como os principais

causadores da doença. Mais recentemente, a pesquisa de alterações nas proteínas hMLH1 e hMSH2, através da imunohistoquímica, no tecido tumoral de pacientes suspeitos de HNPCC tem se mostrado eficaz como exame de rastreamento para posterior indicação do sequenciamento dos genes.

Como vimos anteriormente, existe uma ação conjunta entre os genes de reparo para a execução de sua função, e como hMLH1 e hMSH2 participam dos principais heterodímeros no processo, suas inativações resultam em falha do reparo base/base e das IDLs. Se o resultado do sequenciamento desses dois genes for normal em uma família com suspeita clínica de HNPCC, o sequenciamento do gene hMSH6 pode ser indicado. Apesar de ainda não haver consenso na literatura sobre essa indicação, o número de famílias com mutações detectadas em hMSH6 tem aumentado substancialmente.¹⁵ Até o momento, entre 1% a 3% das famílias com HNPCC apresentam mutações em hMSH6.¹⁴ Os demais genes de reparo, hPMS1 e hPMS2, são esporadicamente descritos como mutados e causadores de HNPCC.¹¹

Pacientes com preenchimento dos Critérios de Amsterdam para diagnóstico clínico de HNPCC podem ter indicação de sequenciamento dos genes hMLH1 e hMSH2 como primeira opção de diagnóstico, com a vantagem do exame ser realizado com sangue periférico.

O primeiro teste de sequenciamento dentro de uma família com diagnóstico clínico de HNPCC deve ser realizado em um indivíduo com tumor (probando), de preferência o mais jovem da família. Esse procedimento deve ser realizado porque, se a família tem o diagnóstico clínico de HNPCC e aquele membro é portador de câncer, é nele que temos a maior probabilidade de detecção da mutação, ou seja, se a mutação for detectável, será nesse indivíduo.³ Seguindo ainda nesse exemplo, se a mutação for detectada nesse indivíduo, teremos um resultado positivo do teste genético de sequenciamento, caracterizando essa família como clínica e molecularmente como HNPCC. Nessa situação, poderemos pesquisar a mesma mutação, característica dessa família, nos demais membros, e diagnosticar quais os indivíduos assintomáticos, mas portadores da predisposição ao câncer. Com isso, a indicação da realização dos exames de seguimento fica restrita aos portadores da predisposição. Como a penetrância dos genes defeituosos de reparo está em torno de 80%, essa é a probabilidade do genótipo transformar-se em fenótipo tumoral nos indivíduos portadores.¹⁶ Membros com teste negativo, ou seja, sem a predisposição detectada na família, ficam liberados do seguimento; porém, recomendamos uma colonoscopia a cada 5 anos para esses indivíduos, principalmente após os 50 anos.

Se imaginarmos essa mesma família citada como exemplo, mas sem a detecção da mutação nos genes de reparo no probando (primeiro membro com câncer testado na família), o teste genético de sequenciamento nesse caso, é chamado de inconclusivo, pois não terá utilidade para rastrear os membros portadores da predisposição e assintomáticos. Nessa situação, a família continua sendo caracterizada clinicamente como HNPCC, mas com teste genético inconclusivo, ou seja, todos os membros passam a ser suspeitos de possuir a

predisposição ao câncer, e, conseqüentemente, devem fazer o seguimento. O que acontece nessas situações é que ainda não temos conhecimento suficiente sobre todos os genes de reparo e suas funções para indicarmos exames moleculares mais específicos.

O seguimento dos indivíduos portadores da mutação de predisposição ao câncer, de famílias com teste genético inconclusivo, e de famílias sem condições de realização do teste genético deve ser realizado com base nas seguintes orientações.³

>Colonoscopia com 1-3 anos de intervalo e início entre os 20-25 anos;

>Ultrassonografia transvaginal anual, com início entre os 25-35 anos;

>Ultrassonografia abdominal e pélvica anual, com início entre os 25-35 anos;

>Exame de urina tipo I e citologia urinária anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com carcinoma de células transicionais de vias excretoras renais;

>Endoscopia digestiva alta com 1-3 anos de intervalo, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com tumores gástricos;

>Dosagem de CA-125 anual, com início entre os 25-35 anos, principalmente nas famílias com câncer de ovário.

Tratamento de indivíduos com câncer e HNPCC

O ponto mais importante no tratamento de pacientes com CCR e HNPCC é a conduta diferenciada com relação a pacientes com CCR esporádico. Pacientes com câncer de cólon e HNPCC devem ser submetidos à colectomia total e anastomose ileorretal, independentemente da localização do tumor no cólon. Essa conduta é indicada devido à alta probabilidade de o indivíduo desenvolver nova lesão colônica no decorrer de sua vida. Esses indivíduos devem fazer retoscopias regularmente, com 1-3 anos de intervalo. Pacientes com câncer de reto e HNPCC devem ser submetidos à proctocolectomia total, se possível com preservação esfinteriana, utilizando-se bolsa ileal e anastomose anal na reconstrução. No caso de comprometimento esfinteriano pelo tumor, deve-se realizar a amputação abdômino-perineal do reto e ânus juntamente com a colectomia total, e uma ileostomia definitiva, que pode ser continente.

Em casos de tumores extracolônicos, a cirurgia deve obedecer os padrões clássicos da cirurgia oncológica para o órgão acometido.

Existe controvérsia sobre a cirurgia profilática, ou seja, remover cirurgicamente um órgão normal de um indivíduo assintomático, sabidamente portador da predisposição genética ao câncer (com teste de sequenciamento positivo). Em nosso ponto de vista, as cirurgias profiláticas não devem ter indicação rotineira, mas devem ser oferecidas como possibilidade aos indivíduos assintomáticos com teste genético positivo.¹⁷ Deve-se colocar a probabilidade de desenvolvimento de câncer, principalmente relacionada à penetrância do gene mutado,

explicar sobre a possibilidade de outros órgãos alvo para o câncer e detalhar sobre as complicações possíveis da cirurgia indicada. Feito isso, a decisão deve ser tomada conjuntamente pelo paciente e pelo médico. As duas cirurgias profiláticas que podem estar indicadas atualmente são:³

>Colectomia total com anastomose ileorretal;

>Histerectomia total com salpingo-ooforectomia bilateral em mulheres pós-menopausadas ou após a idade reprodutiva.

Suporte ao paciente e aconselhamento de risco

Os testes genéticos são apenas uma parte do processo que inclui diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes e famílias suspeitas de HNPCC. No Departamento de Cirurgia Pélvica do Hospital do Câncer A.C. Camargo existe uma rotina de atendimento a esses pacientes. Após a suspeita clínica de CCR hereditário, o paciente é encaminhado para a realização de uma consulta com a finalidade de levantar detalhadamente sua história familiar de câncer. Antes da consulta o paciente é encorajado a trazer outros membros de sua família consigo, de preferência pessoas mais idosas, que tenham conhecimento sobre parentes mais velhos ou distantes, muitas vezes já falecidos. É orientado também a trazer o maior número possível de informações

sobre cada membro de sua família, como por exemplo:

>Nome;

>Data de nascimento e de morte;

>Causa da morte;

>Doenças associadas;

>Cirurgias realizadas.

Nessa primeira consulta é realizada a construção do heredograma, juntamente com preenchimento de uma ficha de dados de cada membro da família, e registro em banco de dados Institucional. Caso se confirme a suspeita clínica de HNPCC, segundo os critérios já expostos, é realizada a indicação de teste genético (MSI ou sequenciamento dos genes de reparo) para o probando, sempre com consentimento informado escrito e assinado. Após o conhecimento do resultado do teste, este é entregue em mãos ao paciente, com total confidencialidade. Inicia-se então o processo de orientação familiar, o qual pode ou não incluir a indicação de testes genéticos para os demais membros da família, com acompanhamento clínico e suporte psicológico. As famílias são classificadas como HNPCC, seguindo os Critérios de Amsterdam para o diagnóstico clínico, ou suspeitas, pelos Critérios de Bethesda. Esquema de atendimento semelhante foi proposto por Lynch e também por outros autores.⁵⁸⁻⁶⁰

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is very frequent in Brazil. Around 3% to 12% of all CRC could be classified as hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). Germ line mutations in the mismatch repair (MMR) genes, mainly hMLH1 and hMSH2, transmitted in an autosomal dominant way, are the only known cause of HNPCC. Clinically, HNPCC is characterized by the Amsterdam Criteria: 3 members with CRC in the same family, in 2 different generations, being 1 member a first degree relative from the other 2, and 1 member younger than 50 years. Endometrial, renal pelvis, ureter, and small bowel carcinomas were considered recently as part of the former Amsterdam Criteria. Microsatellite instability (MSI) in the tumor tissue is present over 90% of the HNPCC patients, being used for screening of suspected cases. Recently, histochemistry has been used for identification of altered hMLH1 and hMSH2 proteins. The definitive diagnosis, with the mutation identification, is made by direct sequencing of the MMR genes. Treatment HNPCC with colon cancer is total colectomy and, with rectal cancer, is total proctocolectomy. In patients with extracolonic tumors, the surgeries follow the standard procedures, according to the affected organs. The follow up intends to search for early colon and extracolonic lesions (endometrium, ureter, renal pelvis, small bowel, stomach and ovaries) amongst the carriers with predisposing mutation or families with HNPCC suspicion. Genetic counseling and multidisciplinary support must be provided from the HNPCC diagnosis.

Referências bibliográficas

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro: INCA; 1999.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics, 2000. CA Cancer J Clin 2000; 50:7-33.
3. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome): an update review. Cancer 1996; 78:1149-67.
4. Rossi BM, Pinho M. Tumores colorretais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M, editores. Genética e biologia molecular para o cirurgião. São Paulo: Lemar; 1999. p.173-200.
5. Warthin AS. Heredity with reference to carcinoma. Arch Intern Med 1913; 12:546-55.
6. Lynch HT, Shaw MW, Magnuson CW, et al. Hereditary factors in cancer: study of two large midwestern kindreds. Arch Intern Med 1966; 117:206-12.
7. Mecklin JP. Frequency of hereditary colorectal carcinoma. Gastroenterology 1987; 93:1021-5.

8. Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. Cell 1993; 75:1027-38.
9. Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, et al. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cell 1993; 75:1215-25.
10. Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. Nature 1994; 368:258-261.
11. Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei, YF et al. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. Science 1994; 263: 625-9.
12. Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, et al. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. Nature 1994; 371:75-80.
13. Drummond JT, Li GM, Longley MJ, et al. Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. Science 1994; 268:1909-12.
14. Palombo F, Gallinari P, Iaccaraino I, et al. GTBP, a 160-kilodalton protein essential for mismatch-binding activity in human cells. Science 1995; 268:1912-14.

15. Jiricny J, Nyström-Lahti M. Mismatch repair defects in cancer. *Curr Opin Genet Dev* 2000; 10:157-61.
16. Lipkin SM, Wang V, Jacoby R, et al. MLH3: a novel DNA mismatch repair gene associated with mammalian microsatellite instability. *Nat Genet* 2000; 24:27-35.
17. Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, et al. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993; 260:812-6.
18. Peltomäki P, Lothe RA, Aaltonen LA, et al. Microsatellite instability is associated with tumors that characterize the hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma syndrome. *Cancer Res* 1993; 53:5853-5.
19. Strand M, Prolla TA, Liskay RM, et al. Destabilization of tracts of simple repetitive DNA in yeast by mutations affecting DNA mismatch repair. *Nature* 1993; 365:274-6.
20. Jiricny J. Replication errors: cha(lle)nging the genome. *Embo J* 1998; 17:6427-36.
21. Fishel R, Wilson T. Muts homologs in mammalian cells. *Curr Opin Genet Dev* 1997; 7:105-13.
22. Blackwell LJ, Martik D, Björnson KP, et al. Nucleotide-promoted release of hMutSa from heteroduplex DNA is consistent with an ATP-dependent translocation mechanism. *J Biol Chem* 1998; 273:32055-62.
23. Gradia S, Subramanian D, Wilson T, et al. hMSH2-hMSH6 forms a hydrolysis-independent sliding clamp on mismatched DNA. *Mol Cell* 1999; 3:255-61.
24. Iaccarino I, Marra G, Dufner P, et al. Mutation of the magnesium binding site of hMSH6 disables the hMutSa sliding clamp from translocating along DNA. *J Biol Chem* 2000; 275:2080-6.
25. Kolodner RD, Marsischky GT. Eukaryotic DNA mismatch repair. *Curr Opin Genet Dev* 1999; 9:89-96.
26. Räsche M, Marra G, Nyström-Lahti M, et al. Identification of hMutLb, a heterodimer of hMLH1 and hPMS1. *J Biol Chem* 1999; 274:32368-75.
27. Fishel R. Signaling mismatch repair in cancer. *Nature Med* 1999; 5:1239-41.
28. Parsons R, Li G, Longley M, et al. Mismatch repair deficiency in phenotypically normal human cells. *Science* 1995; 268:738-40.
29. Bhattacharyya NP, Skandalis A, Ganesh A, Groden J, Meuth M. Mutator phenotypes in human colorectal carcinoma cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91:6319-23.
30. Shibata D, Peinado MA, Ionov Y, Malkhosyan S, Perucho M. Genomic instability in repeated sequences is an early somatic event in colorectal carcinoma cell lines. *Nat Genet* 1994; 6:273-81.
31. Camargo AA, Dias Neto E, Simpson AJG. Mutação e câncer. In: Rossi BM, Pinho M, editores. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar; 1999. p.111-23.
32. Shimodaira H, Filosi N, Shibata H, et al. Functional analysis of human MLH1 mutations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nat Genet* 1998; 19: 384-9.
33. Clark AB, Cook ME, Tran HT, et al. Functional analysis of human MutSa and MutSb complexes in yeast. *Nucleic Acids Res* 1999; 27:736-42.
34. Drotschmann K, Clark AB, Kunkel TA. Mutator phenotypes of common polymorphisms and missense mutations in MSH2. *Curr Biol* 1999; 9:907-10.
35. Shcherbakova PV, Kunkel TA. Mutator phenotypes conferred by MLH1 overexpression and by heterozygosity for mlh1 mutations. *Mol Cell Biol* 1999; 19:3177-83.
36. Guerrette S, Wilson T, Gradia S, et al. Interactions of human hMSH2 with hMSH3 and hMSH2 with hMSH6: examination of mutations found in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Mol Cell Biol* 1998; 18:6616-23.
37. Guerrette S, Acharya S, Fishel R. The interaction of the human MutL homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *J Biol Chem* 1999; 274:6336-41.
38. Bayley-Wilson JE, Elston RC, Schuelke GS, et al. Segregation analysis of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Genet Epidemiol* 1986; 3:27-38.
39. Vasen HFA, Mecklin JP, Khan PM, et al. The International Collaborative Group on hereditary non-polyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Colon Rectum* 1991; 34:424-5.
40. Vasen HFA, Watson P, Mecklin JP, et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116:1453-6.
41. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, et al. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1758-62.
42. Jass JR, Stewart SM. Evolution of hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Gut* 1992; 33:783-6.
43. Lanspa SJ, Jenkins JX, Cavalieri J, et al. Surveillance in Lynch syndrome: how aggressive? *Am J Gastroenterol* 1994; 89:1978-80.
44. Sankila R, Aaltonen LA, Jarvinen HJ, et al. Better survival rates in patients with MLH1-associated hereditary colorectal cancer. *Gastroenterology* 1996; 110:682-7.
45. Winawer S, Zaubler AG, O'Brien MJ, et al. Randomized comparison of surveillance intervals after colonoscopic removal of newly diagnosed adenomatous polyps: The National Polyp Study Workgroup. *N Engl J Med* 1993; 328:901-6.
46. Muir EG, Bell AJ, Barlow KA. Multiple primary carcinomata of the colon, duodenum, larynx associated with keratoacanthomata of the face. *Br J Surg* 1966; 54:191-5.
47. Torre D. Multiple sebaceous tumors. *Arch Dermatol* 1968; 98:549-51.
48. Hall NR, Murday VA, Chapman P, et al. Genetic linkage in Muir-Torre syndrome to the same chromosomal region as cancer family syndrome. *Eur J Cancer* 1994; 30A:180-2.
49. Spirio L, Olschwang S, Groden J, et al. Alleles of the APC gene: an attenuated form of familial polyposis. *Cell* 1993; 75:951-7.
50. Lynch HT, Smyrk T, McGinn T, et al. Attenuated familial adenomatous polyposis (AFAP): a phenotypically and genotypically distinctive variant of FAP. *Cancer* 1995; 76:2427-33.
51. Jass JR, Smyrk TC, Stewart SM, et al. Pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Anticancer Res* 1994; 14:1631-4.
52. De La Chapelle A. Testing tumors for microsatellite instability. *Eur J Hum Genet* 1999; 7:407-8.
53. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study: The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterology* 1997; 113:1146-58.
54. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, et al. Germline MSH6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 1999; 59:5068-74.
55. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen H, et al. Familial endometrial cancer in female carriers of MSH6 germline mutations. *Nat Genet* 1999; 23:142-4.
56. Vasen HFA, Wijnen JT, Menko FH, et al. Cancer risk in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer diagnosed by mutation analysis. *Gastroenterology* 1996; 110:1020-7.
57. Rodriguez-Bigas MA. Prophylactic colectomy for gene carriers in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1996; 78:199-201.
58. Lynch HT, Watson P, Shaw TG, et al. Clinical impact of molecular genetic diagnosis, genetic counseling, and management of hereditary cancer (Part I: studies of cancer families). *Cancer* 1999; 86:1629-36.
59. Thompson JA, Wiesner GL, Sellers TA, et al. Genetic services for familial cancer patients: a survey of National Cancer Institute Cancer Centers. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87:1446-55.
60. Burke W, Petersen G, Lynch P, et al. Recommendations for follow-up care of individuals with an inherited predisposition to cancer. *JAMA* 1997; 277:915-9.

ANEXO 6

Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families

An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry

Fábio Oliveira Ferreira, Claudia Cristina Napoli Ferreira, Benedito Mauro Rossi,
Wilson Toshihiko Nakagawa, Samuel Aguiar Jr, Erika Maria Monteiro Santos,
Marcelo Leite Vieira Costa and Ademar Lopes

*Hereditary Colorectal Cancer Registry, Department of Pelvic Surgery, Hospital do Cancer A.C. Camargo,
Antonio Prudente Foundation, São Paulo, Brazil*

Received 29 January 2003; accepted in revised form 29 September 2003

Key words: colorectal neoplasms, familial cancer, genetics

Abstract

The two main forms of hereditary colorectal cancer are familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC). Some families do not meet all the diagnostic criteria for HNPCC or FAP and are classified as familial colorectal cancer (FCC). Little information is available on the spectrum of tumors related to HNPCC and FCC in South America. **Objective:** To describe the frequency of malignant tumors in a group of Brazilian families with HNPCC or FCC in an Institutional Hereditary Colorectal Cancer Registry. **Material and methods:** The study included 61 families (29 HNPCC and 32 FCC) between January 1998 and June 2001. HNPCC families were clinically classified according to the Amsterdam Criteria I or II. FCC families were characterized by the presence of at least two individuals with CRC or extra-colonic tumors associated with the HNPCC spectrum, at least one of them being under 50 years of age. **Results:** In the 29 families with HNPCC, 201 patients with cancer were identified among 1241 individuals (589 men and 652 women). Among the 201 patients 223 tumors were observed: 137 CRC (55 in men and 82 in women) and 86 extra-colonic (37 in men and 49 in women). In the 32 families with FCC, 146 patients with cancer were identified among 1053 individuals (505 men and 548 women); 158 tumors were observed in 146 patients, 75 CRC (33 in men and 42 in women) and 83 extra-colonic tumors (47 in men and 36 in women). The most frequent extra-colonic primary sites among the HNPCC families were: endometrium (26.5%) and breast (26.5%) (women), and stomach (35.1%) (men). Among the FCC families, the most common primary sites were: breast (27.8%) (women), and stomach (44.4%) (men). **Conclusion:** The high frequency of endometrial and gastric cancer found was expected, since these tumors are part of the HNPCC spectrum, but the high frequency of breast cancer requires further molecular investigation to determine a possible hereditary predisposition associated with hereditary CRC.

Abbreviations: CRC – colorectal cancer; FCC – familial colorectal cancer; HNPCC – hereditary nonpolyposis colorectal cancer

Introduction

Hereditary colorectal cancer is basically due to two syndromes: familial adenomatous polyposis (FAP) and hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), which represents about 1% and 7% of the total cases of colorectal cancer (CRC), respectively [1, 2]. In Brazil, the number of new cases of CRC estimated for

2003 is 9530 in men and 10,545 in women, which shows a proportional incidence rate of 10.96/100,000 (men) and 11.73/100,000 (women) [3]. The estimated base for the year 2003 is between 1024 and 3011 new cases of hereditary CRC.

In HNPCC the diagnosis is based on the Amsterdam Criteria [4]. According to the ICG-HNPCC criteria (Amsterdam Criteria I), the family should present the

following characteristics: three individuals with CRC, one being a first-degree relative of the other two in at least two affected successive generations; at least one of the individuals with CRC should be under 50 years of age. FAP should be excluded and CRC should be confirmed by pathological examination. Some extra-colonic tumors are part of the HNPCC spectrum (endometrium, renal pelvis and ureter, small intestine, stomach, ovary, central nervous system, hepato-biliary tract and tumors of sebaceous glands). Tumors of the endometrium, renal pelvis/ureter and small intestine were included in the ICG-HNPCC criteria (Amsterdam Criteria II) [5]. Some CRC families do not meet all the prerequisites for classification as HNPCC. These families can be classified as familial colorectal cancer (FCC).

HNPCC is an autosomal dominant syndrome with high penetrance (about 85%), due to mutations in the mismatch repair genes [6–9]. The main genes involved are MSH2, MLH1, PMS1, PMS2 and MSH6 [5, 10, 11]. In different geographical areas the frequency and the types of mutations vary. It is therefore possible that the frequency of extra-colonic tumors associated with HNPCC may also be different in different countries [12–14]. Until now, relatively little information has been made available on the spectrum of tumors related to HNPCC in South America. The objective of this study is to describe the frequency of malignant tumors in a group of Brazilian families of HNPCC and FCC in an Institutional Hereditary Colorectal Cancer Registry.

Materials and methods

The study used the database of the Hereditary Colorectal Cancer Registry of the Pelvic Surgery Department of the Research and Treatment Center Hospital of Cancer A.C. Camargo (São Paulo, Brazil). The families analyzed were classified as HNPCC or FCC and were registered in the period between January 1998 and June 2001. The HNPCC families were clinically classified according to Amsterdam Criteria I or II. The FCC families were characterized by the presence of at least two individuals with CRC or extra-colonic tumors associated with the HNPCC spectrum, at least one of the individuals with the diagnosis of cancer being under 50 years of age.

Patients and relatives were interviewed after informed consent. The following data were analyzed in each family: total number of members, number of patients with CRC, number of patients with extra-colonic tumors, primary sites of the extra-colonic tumors, ages at diagnosis and number of generations evaluated.

In both groups (HNPCC and FCC) the diagnosis of extra-colonic tumor was based on confirmed clinical or pathological information. Cases with uncertain information were not considered. When it was not possible

to identify the main organ of the primary tumor, the site was considered as unknown.

Results

The study included 61 families. 29 with HNPCC (25 Amsterdam I and 4 Amsterdam II) and 32 with FCC. There were 1241 individuals in the HNPCC families and 1053 in FCC the families. The number of individuals in HNPCC families varied from 4 to 140 (mean 42.8; median 35), with evaluation of 5 generations in 8 families (27.6%), 4 generations in 17 families (58.6%) and 3 generations in 4 families (13.8%). In the FCC families, the number of individuals varied from 3 to 95 (mean 32.9; median 30.5), with evaluation of 5 generations in 6 families (18.75%), 4 generations in 16 families (50%), 3 generations in 8 families (25%) and 2 generations in 2 families (6.25%).

In the 29 HNPCC families, 201 patients with cancer were identified among 1241 individuals (589 men and 652 women). The 201 patients revealed 223 tumors: 137 colorectal tumors (55 in men and 82 in women) and 86 extra-colonic tumors (37 in men and 49 in women) (Table 1). The age at diagnosis of the first tumor varied from 21 to 80 years (mean 42.6 years; median 42 years; information available for 55 of the 201 patients). A second primary tumor was present in 21 patients: CRC in 7, endometrium in 4, breast in 3, stomach in 2, ovary in 2, hepato-biliary in 2 and prostate in 1. The age at diagnosis of the second primary tumor varied from 31 to 59 years (mean 41.2; median 38; information available for 6 of the 21 patients). One patient presented three different primary tumors: colon cancer at 26, endometrial at 31, and sebaceous carcinoma at 31 years.

In the 32 FCC families, 146 patients with cancer were identified among 1053 individuals (505 men and 548 women). In 146 patients 158 tumors were observed: 75 colorectal (33 in men and 42 in women) and 83 extra-colonic tumors (47 in men and 36 in women) (Table 1). The age at diagnosis of the first tumor varied from 2 to 93 years (mean 49.89 years; median 50 years; information available for 106 of the 146 patients). The two-year-old patient was a child with central nervous system tumor (CNS). The second young patient had a colon tumor diagnosed at the age of 9. In the FCC families, 9 patients presented a second primary tumor: CRC in 6, CNS in 1, prostate in 1, unknown primary site in 1. The age at diagnosis of the second primary tumor varied from 34 to 67 years (mean 45.17 years; median 41.5 years; available information for 6 of the 9 patients). Two patients presented 3 primary tumors: a case with two CRC and cancer of the ureter, respectively at 40, 42 and 47 years; and another case with breast cancer, oral cavity and CRC, at 30 years, 34 years and unknown age, respectively.

The more frequent primary sites in the HNPCC families were: endometrium (26.5%) and breast (26.5%) in women, and stomach (35.1%) in men. In the FCC

Table 1. Number of CRC and extra-colonic tumors in HNPCC and FCC Brazilian families.

HNPCC					FCC										
Fam	Male			Female			Fam	Male			Female				
	Number of generations	N	N CRC	N extra-colonic tumors	N	N CRC		N extra-colonic tumors	Number of generations	N	N CRC	N extra-colonic tumors	N	N CRC	N extra-colonic tumors
1	5	70	4	0	1	8	1	1	4	19	0	1	29	2	0
2	5	23	1	0	3	6	2	2	2	2	2	0	1	1	0
3	4	35	2	4	1	2	3	3	28	1	1	4	25	1	3
4	5	31	3	2	4	3	4	5	11	2	2	2	10	2	0
5	5	19	2	0	0	2	5	3	3	1	1	0	8	2	0
6	4	16	3	0	3	1	6	3	3	1	2	2	3	0	1
7	3	5	4	0	0	0	7	5	44	1	1	1	51	2	2
8	4	19	2	0	0	1	8	4	17	2	2	0	24	2	1
9	5	7	2	2	2	4	9	5	18	0	0	1	18	3	3
10	4	19	0	6	3	4	10	3	18	1	1	0	12	1	0
11	3	11	1	5	2	4	11	4	13	1	1	2	13	1	1
12	5	53	0	0	2	4	12	4	14	0	0	2	14	2	0
13	3	6	1	0	0	2	13	4	17	2	2	0	14	1	0
14	4	29	2	0	1	2	14	5	19	2	2	0	6	0	1
15	4	11	0	2	0	2	15	4	27	1	1	4	35	3	1
16	4	26	3	0	4	0	16	4	19	0	0	4	25	0	5
17	4	7	6	0	2	1	17	3	16	3	3	0	17	0	1
18	5	35	5	0	0	6	18	3	19	0	0	1	19	1	1
19	5	10	2	0	1	3	19	4	22	1	1	5	31	0	6
20	4	38	1	4	0	3	20	3	0	0	0	0	3	2	2
21	4	23	1	5	3	4	21	5	17	3	3	1	7	1	0
22	4	23	3	5	2	1	22	2	4	2	2	0	3	0	0
23	3	0	0	0	3	2	23	4	10	2	2	2	7	0	0
24	4	8	1	0	1	2	24	4	10	0	0	2	15	4	3
25	4	14	1	0	2	5	25	4	8	0	0	0	13	2	0
26	4	19	0	1	3	4	26	4	17	0	0	2	18	1	2
27	4	12	2	0	1	1	27	4	13	0	0	6	9	2	2
28	4	12	1	1	3	1	28	5	16	2	2	1	24	1	0
29	4	8	2	0	2	4	29	4	7	0	0	0	10	2	1
							30	4	33	1	1	0	44	1	0
							31	4	24	2	2	3	18	0	0
							32	3	17	0	0	1	22	2	0
Total		589	55	37			Total		505	33	47		548	42	36

HNPCC – hereditary non-polypoid colorectal cancer; FCC – familial colorectal cancer; Fam – families; CRC – colorectal cancer.

Source: Hereditary Colorectal Cancer Registry, Department of Pelvic Surgery, Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil (January 1998–June 2001).

Table 2. Extra-colonic tumor sites in HNPCC and FCC families according to gender.

Extra-colonic tumor site	Male				Female			
	HNPCC (<i>n</i> = 37)		FCC (<i>n</i> = 47)		HNPCC (<i>n</i> = 49)		FCC (<i>n</i> = 36)	
	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)	<i>n</i>	(%)
Endometrium	–	–	–	–	13	(26.5)	3	(8.3)
Renal pelvis/ureter	2	(5.4)	1	(2.1)	1	(2.0)	0	(0.0)
Small bowel	0	(0.0)	0	(0.0)	1	(2.0)	0	(0.0)
Stomach	13	(35.1)	19	(40.4)	5	(10.2)	5	(13.9)
Hepatobiliary tract	4	(10.8)	2	(4.3)	1	(2.0)	1	(2.8)
Pancreas	1	(2.7)	1	(2.1)	0	(0.0)	0	(0.0)
Ovary	–	–	–	–	2	(4.1)	0	(0.0)
Central nervous system	1	(2.7)	3	(6.4)	2	(4.1)	3	(8.3)
Lung	4	(10.8)	4	(8.5)	3	(6.1)	0	(0.0)
Leukemia	4	(10.8)	3	(6.4)	0	(0.0)	0	(0.0)
Prostate	2	(5.4)	7	(14.9)	–	–	–	–
Breast	–	–	–	–	13	(26.5)	10	(27.8)
Uterine cervix	–	–	–	–	2	(4.1)	3	(8.3)
Unknown	6	(16.2)	7	(14.9)	6	(12.2)	11	(30.5)

Source: See Table 1.

families, the most common primary sites were: breast (27.8%) in the women, and stomach (44.4%) in the men. The incidence of extra-colonic tumors according to the main organs of the primary tumor is given in Table 2.

Figures 1–4 show the extra-colonic tumors in HNPCC and FCC families.

Discussion

Due to significant progress achieved in our understanding of the genetic bases of CRC the identification of families with genetic predisposition has assumed an important role in clinical practice. This development has led to the creation of hereditary cancer registries throughout the world, permitting the standardization of medical practise with improvements in the treatment of families with hereditary CRC [15].

The current population of Brazil is about 169 million. The Ministry of Health estimates about 402,190 new

cancer cases, with 126,960 deaths throughout Brazil for the year 2003 [3]. The estimates for 2003 show that, if non-melanoma skin cancer is excluded, CRC is the fourth most frequent tumor among men and the third among women. Between 1979 and 2000, the CRC statistics showed a relative percentage variation of +76.7% among men, from 2.44/100,000 to 4.32/100,000, and +69% among women, from 2.80/100,000 to 4.75/100,000. For the whole country, the number of expected deaths from CRC for the year 2003, for men and women, are 3700 and 4270, respectively, corresponding to an approximate mortality rate of 4.24/100,000 (men) and 4.73/100,000 (women). The estimated number of new CRC cases in 2003 are 9530 in men and 10,545 in women, which reflects a proportional incidence rate of 10.96/100,000 (men) and 11.73/100,000 (women). As a functional reference for the year 2003 it is considered that the fraction of CRC associated with HNPCC and FAP in Brazil may be similar to that reported in other countries. The number

Figure 1. Frequency of extra-colonic tumor sites among individuals with cancer in HNPCC families – men. Source: See Table 1.

Figure 2. Frequency of extra-colonic tumor sites among individuals with cancer in FCC families – men. Source: See Table 1.

Figure 3. Frequency of extra-colonic tumor sites among individuals with cancer in HNPCC families – women. Source: See Table 1.

Figure 4. Frequency of extra-colonic tumor sites among individuals with cancer in FCC families – women. Source: See Table 1.

of new hereditary CRC cases can be estimated as between 1204 and 3011. Large families and social-cultural problems hamper the acquisition of reliable information.

Genotype–phenotype data in families classified as HNPCC necessitated a better syndrome characterization [5, 16–24]. In 1999, tumors of the endometrium, renal pelvis, ureter and small bowel were included in the syndrome criteria [5].

The Hereditary Colorectal Cancer Registry of the Pelvic Surgery Department, Hospital of Cancer A.C. Camargo, São Paulo, was founded in 1992 and currently has 250 registered families. The majority of the families registered in this study were from the municipal district of São Paulo where, excluding non-melanoma skin cancer, CRC occupies the second place in incidence among men and women in São Paulo [3].

When we consider the frequency of extra-colonic

tumors in men, gastric tumors occupied the first place in the HNPCC families as well as in FCC families. In São Paulo, stomach cancer occupies the third place in incidence among men and the fourth place among women. Thirteen cases of gastric cancer were noted in 589 men from the HNPCC families and 19 cases in 505 FCC men, which would represent a rate of incidence of 2207.13/100,000 and 3762.37/100,000, respectively. Among the women, 5 cases of gastric cancer were found in 652 women from HNPCC families and 5 cases in 548 women from FCC families (766.87/100,000) (912.40/100,000). Breast cancer and cancer of the endometrium were the more frequent extra-colonic tumors in women from the HNPCC families studied (26.5% each). In 652 women from HNPCC families 13 cases of breast cancer were noticed (1993.86/100,000) and 10 cases in 548 women from FCC families (1824.81/100,000). High frequencies of gastric and endometrium cancer were expected, since those tumors are part of the HNPCC spectrum, but we also found a high frequency of breast cancer. Excluding non-melanoma skin cancer, breast cancer occupies the first place in incidence among women in São Paulo city, with 6090 new cases in the year 2002 (106.66/100,000). The high incidence of breast cancer observed in the families studied requires further molecular investigation to determine a possible hereditary correlation.

Several studies have addressed breast cancer as a possible part of the HNPCC tumor spectrum; these studies are not mentioned in this discussion.

Three cases of tumor of renal pelvis/ureter and one case of small bowel tumor were noted in the HNPCC families. These tumors which are rare in the general population indicate a clinical expression of the syndrome. The occurrence of rare tumors (part of the HNPCC spectrum) in the FCC families suggests that some members of these families must have a genetic predisposition similar to HNPCC, but do not meet the clinical prerequisites of HNPCC syndrome.

A general awareness of hereditary cancer among both the medical community and the general population of Brazil would lead to the creation of a true national registry. This would not only afford a better clinical classification of the hereditary cancer families, it would also enable improvements in treatment and outcome.

Acknowledgements

We thank the Hereditary Colorectal Cancer Registry, Department of Pelvic Surgery, Hospital do Cancer A.C. Camargo, São Paulo, Brazil, for supplying the data for the tables and figures for the period January 1998–June 2001.

References

1. Cunningham C, Dunlop MG. Molecular genetic basis of colorectal cancer susceptibility. *Br J Surg* 1996; 83: 321–9.
2. Salovaara R, Loukola A, Kristo P et al. Population-based molecular detection of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2000; 18: 2193–200.
3. Ministry of Health/National Institute of Cancer-Inca. Estimates of the incidence and mortality of cancer in Brazil. Rio de Janeiro: INCA, 2003.
4. 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.
5. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 1999; 116 (6): 1453–6.
6. Lynch HT, Smyrk TC, Watson P et al. Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993; 104 (5): 1535–49.
7. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: The syndrome, the genes, and historical perspectives. *J Natl Cancer Inst* 1995; 87 (15): 1114–25.
8. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). An updated review. *Cancer* 1996; 78 (6): 1149–67.
9. Lynch HT, Smyrk T, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93 (1): 84–99.
10. Peltomäki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of the collaborative study. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. *Gastroenterol* 1997; 113 (4): 1146–58.
11. Giardiello FM. Genetic testing in hereditary colorectal cancer. *JAMA* 1997; 278 (15): 1278–81.
12. Bai YQ, Akiyama Y, Nagasaki H et al. Predominant germ-line mutation of the hMSH2 and hMLH1 gene in Japanese hereditary non-polyposis colorectal cancer kindreds. *Int J Cancer* 1999; 82 (4): 512–5.
13. Kim JC, Kim HC, Roh SA et al. hMLH1 and hMSH2 mutations in families with familial clustering of gastric cancer and hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Cancer Detect Prev* 2001; 25(6): 503–10.
14. Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002; 9(6): 555–61.
15. Rossi BM, Corvello CM, Epelman C et al. Hereditary colorectal tumors: routine care and the multidisciplinary therapeutic approach. *S Am J Cancer* 1997; 1: 191–7.
16. Beck NE, Tomlinson IP, Homfray T et al. Genetic testing is important in families with a history suggestive of hereditary non-polyposis colorectal cancer even if the Amsterdam criteria are not fulfilled. *Br J Surg* 1997; 84 (2): 233–7.
17. Weber TK, Conlon W, Petrelli NJ et al. Genomic DNA-based hMSH2 and hMLH1 mutation screening in 32 Eastern United States hereditary nonpolyposis colorectal cancer pedigrees. *Cancer Res* 1997; 57 (17): 3798–803.
18. Kunitomo K, Terashima Y, Sasaki K et al. HNPCC in Japan. *Anticancer Res* 1992; 12: 1856–7.
19. Ponz de Leon M, Sassatelli R, Benatti P, Roncucci L. Identification of hereditary nonpolyposis colorectal cancer in the general population. The 6-year experience of a population based registry. *Cancer* 1993; 71 (11): 3493–501.
20. Madlensky L, Berk TC, Bapat BV et al. A preventive registry for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Can J Oncol* 1995; 5 (2): 355–60.

21. Han HJ, Yuan Y, Ku JL et al. Germline mutations of hMLH1 and hMSH2 genes in Korean hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *J Natl Cancer Inst* 1996; 88 (18): 1317–9.
22. Kuska B. New diagnostic criteria for HNPCC are on the way. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89 (1): 11–2.
23. Menko FH. Familial and hereditary colorectal cancer. In: Menko FH (ed) *Genetics of Colorectal Cancer for Clinical Practice*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers 1993, 58–112.
24. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR et al. National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: Meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89 (23): 1758–62.

ANEXO 7

ORIGINAL REPORT

Clinicopathological Significance of BAT26 Instability in 184 Patients with Colorectal Cancer

Fabricio Carvalho¹; Erika M. Monteiro Santos², RN, MS; Sergio D. Pena³, MD, PhD; André Vettore¹, PhD; Ademair Lopes², MD, PhD; Fabio O. Ferreira², MD, PhD; Samuel Aguiar Junior², MD, MS; Wilson T. Nakagawa², MD, MS; Benedito M. Rossi², MD, PhD

1 Ludwig Institute for Cancer Research – Sao Paulo Branch - São Paulo, Brazil

2 Pelvic Surgery Department – A.C. Camargo Cancer Hospital – São Paulo, Brazil

3 Department of Biochemistry – Federal University of Minas Gerais - Belo Horizonte, Brazil

ABSTRACT

Microsatellite instability (MSI) occurs in 90% of colorectal cancer (CRC) from HNPCC patients and 15% of sporadic CRC. Patients with CRC and MSI have a distinct phenotype. OBJECTIVE: this study evaluates the isolated clinicopathological significance of BAT26 instability by itself in patients with CRC. METHODS: From 1995 to 2000, 184 patients submitted to CRC surgery were selected at random. Medical records were studied in order to determine clinical data and BAT26 analysis was carried out. RESULTS: BAT26 instability was found in 22 (12%) of the 184 cases and was correlated to proximal colon tumors ($p < 0.001$); CRC from HNPCC patients ($p = 0.002$); poor cell differentiation ($p = 0.025$); and mucinous component ($p = 0.007$). BAT26 instability tumors have shown a slight trend toward absence of metastases ($p = 0.082$). The five-year cancer-specific survival was 65% and 85% for stable and unstable BAT26, respectively, with no statistical significance. CONCLUSION: BAT26 instability should be considered a useful screening method to select CRC patients for MSI.

Key words: Microsatellite Repeats. Colorectal Neoplasms/pathology.

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is the sixth in incidence in Brazil. In Southeastern Brazil, though, it is the second most frequent cancer in males, behind prostate cancer, and the third in females, behind breast and uterine cervix cancer. Regardless gender, CRC is the second most common, just after breast cancer, with an estimate of 9,400 new cases per year,¹ whereas in the USA estimated number is 130,200.²

Familial Adenomatous Polyposis (FAP)

and Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (HNPCC) are the two major inherited syndromes related to the development of CRC. In Brazil, FAP and HNPCC are responsible for about 1% and 3% to 8% of CRC cases, respectively. Although there is no data on the incidence of HNPCC, it might be around 752 new cases per year against 10,416 in USA.^{3,4}

Besides these two classical syndromes, there still are other ones like recessive familial adenomatous polyposis, linked to *MYH* gene, and hamartomatous polyposis like Peutz-Jeghers syndrome. Although not typically characterized as inherited or sporadic, one very important family group comprises CRC cases and other types of cancer including those associated to HNPCC. This group represents 20%-30% of new CRC cases and their study may help to characterize new genes and syndromes. Therefore, this problem should be carefully investigated especially within the Brazilian population, with such peculiar genetics influenced by Africans, Native Brazilians, and Europeans.

Microsatellite instability (MSI) is recognized as genome-wide alterations in repetitive DNA sequences caused by defects in mismatch repair (MMR) genes, mainly *hMLH1*

Correspondence

Erika M. Monteiro Santos

Departament of Pelvic Surgery

A.C. Camargo Cancer Hospital

Rua Prof. Antonio Prudente, 211

01509-900 São Paulo, Brazil

Phone: 55 11 32070500

E-mail: emonteiro@hcancer.org.br

and *hMSH2*. MSI occurs in about 90% of HNPCC tumors and 15% of sporadic CRC.⁵⁻⁷ Patients with CRC and MSI have a distinct phenotype: proximal tumor location, poor differentiation, mucinous component, older onset of the disease, increased number of tumors and better prognosis, although a controversial result in some studies.⁸

Bethesda guidelines⁹ have established that a panel with five microsatellites should be done for HNPCC suspected patients with CRC: BAT25; BAT26; D2S123; D5S346 and D17S250. If two or more of the five microsatellite sequences in the tumor DNA have been mutated, then the tumor is named MSI-high (MSI-H). If only one of the five have been mutated, then the tumor is named MSI-low (MSI-L). If none of the sequences have been mutated, then the tumor is named microsatellite stable (MSS).⁹⁻¹⁰ In general, patients with MSI-L tumors are classified as MMS, but it is recommended an additional panel of microsatellite sequences for testing accurately the tumor characterization. Some authors have suggested that, BAT26 should be the first only test to screen suspected MSI CRC tumors¹¹, and even that, somatic mutations in the BAT26 sequence accumulate in peripheral blood lymphocytes far before tumor diagnosis in MMR mutation carriers¹².

The objective of this study is to evaluate the clinicopathological significance of BAT26 instability, as the only marker, in 184 patients with CRC.

MATERIAL AND METHODS

PATIENTS

From 1995 until 2000, 184 patients were selected at random from 554 consecutive patients who underwent surgery for CRC at the Department of Pelvic Surgery, A.C. Camargo Cancer Hospital, Sao Paulo, Brazil.

Patient medical records were studied in order to determine clinical data including: age, gender, tumor location, surgery intention (palliative or curative), recurrence, level of CEA and CA 19.9. The pathological characteristics included: mucinous component, cell differentiation, vascular and lymphatic embolization, perineural invasion and tumor stage.

MICROSATELLITE INSTABILITY ANALYSIS

Tumor tissue was grossly dissected from adjacent normal tissue from one single paraffin block per case. Genomic DNA from 6 formalin-fixed, paraffin-embedded sections was extracted with the Nucleon HT kit (Amersham Biosciences), according to the manufacturer's instructions.

Microsatellite analysis was carried out using BAT26 marker. The primers used for amplification of the BAT26 adenine mononucleotide repeat located within intron 5 of the *hMSH2* gene were 5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3' (sense) and 5'-ACCATTC AACATTTTAAACC-3' (antisense). The sense primer was labeled with the fluorescein 6-FAM.

PCR amplification of DNA was performed in a final volume of 25 µl containing 50-100 mg of genomic DNA, 1X PCR buffer, 3 mM MgCl₂, 200 µM of each dNTP, 0.4 µM of each primer, 2 units of Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen). The thermal conditions were 94°C for 5 min followed by 40 cycles (94°C for 1 min, 50°C for 1 min and 72°C for 1 min) and a final extension at 72°C for 7 min.

The dye-labelled PCR products were analyzed on ABI PRISM 3100 Genetic Analyser using Genescan 3.7 software (Applied Biosystems).

STATISTICAL ANALYSIS

Statistical analysis was performed using the SPSS software (version 10.0). The Fisher exact test was used to investigate the associations of BAT26 status with independent variables. Two-tailed $p < 0.05$ was considered statistically significant.

Survival data was obtained using the Kaplan-Meier method, and comparison of survival was made using the log-rank test, with $p < 0.05$ as the significant limit.

RESULTS

Among 184 patients with CRC, 22 have shown BAT26 instability (12%). The average and median age was 61 and 64 year-old, respectively (29 to 92). Relationships between BAT26 status and clinical and pathological variables are presented in Table 1 and Table 2, respectively.

Table 1 – Clinical characteristics of colorectal cancer patients according to BAT26 status

Characteristic		Stable	Instable	Total	p*
Age	≤ 60 y.o.	72 (44.4%)	7 (31.8%)	79 (42.9%)	0.359
	> 60 y.o.	90 (55.6%)	15 (68.2%)	105 (57.1%)	
Gender	Men	72 (44.4%)	6 (27.3%)	78 (42.4%)	0.168
	Women	80 (55.6%)	16 (72.7%)	106 (57.6%)	
HNPCC	No	160 (98.8%)	18 (81.8%)	178 (96.7%)	0.002
	Yes	2 (1.2%)	4 (18.2%)	6 (3.3%)	
Tumor location	Proximal	29 (17.9%)	18 (81.8%)	47 (25.5%)	<0.001
	Distal	133 (82.1%)	4 (18.2%)	137 (74.5%)	
Type of surgery	Curative	132 (81.5%)	21 (95.5%)	153 (83.2%)	0.132
	Paliative	30 (18.5%)	1 (4.5%)	31 (16.8%)	
CEA**	≤ 5 ´g/L	64 (62.7%)	11 (73.3%)	75 (64.1%)	0.587
	> 5 ´g/L	38 (37.3%)	4 (26.7%)	42 (35.9%)	
CA19.9***	≤ 37 U/ml	72 (84.7%)	9 (81.8%)	81 (84.4%)	0.681
	> 37 U/ml	13 (15.3%)	2 (18.2%)	15 (15.6%)	
Recurrence#	No	102 (79.1%)	19 (90.5%)	121 (80.7%)	0.370
	Yes	27 (20.9%)	2 (9.5%)	29 (19.3%)	

* p: Fisher exact test; ** 67 patients without information; *** 88 patients without information; # pacientes submmited to palliative surgery were excluded

Table 2 – Pathological characteristics of colorectal tumors according to BAT26 status

Characteristic		Stable	Instable	Total	p*
T stage**	1 and 2	44 (27.5%)	3 (14.3%)	47 (26.0%)	0.290
	3 and 4	116 (72.5%)	18 (85.7%)	134 (74.0%)	
N status**	Negative	98 (61.6%)	12 (54.5%)	110 (60.8%)	0.642
	Positive	61 (38.4%)	10 (45.5%)	71 (39.2%)	
M status	Negative	127 (78.4%)	21 (95.5%)	148 (80.4%)	0.082
	Positive	35 (21.6%)	1 (4.5%)	36 (19.6%)	
Differentiation***	Well/	155 (98.1%)	19 (86.4%)	174 (96.7%)	0,025
	Moderate				
	Poor	3 (1.9%)	3 (13.6%)	6 (3.3%)	
Venous invasion#	No	114 (72.6%)	18 (81.8%)	132 (73.7%)	0.445
	Yes	43 (27.4%)	4 (18.2%)	47 (26.3%)	
Lymphatic invasion#	No	77 (49.0%)	13 (59.1%)	90 (50.3%)	0.496
	Yes	80 (51.0%)	9 (40.9%)	89 (49.7%)	
Neural invasion##	No	107 (69.9%)	19 (86.4%)	126 (72.0%)	0.132
	Yes	46 (30.1%)	3 (13.6%)	49 (28.0%)	
Mucinous component	No	147 (90.7%)	15 (68.2%)	162 (88.0%)	0.007
	Yes	15 (9.3%)	7 (31.8%)	22 (12.0%)	

*p: Fisher exact test; ** 3 patients without information; *** 4 patients without information; #5 patients without information; ## 9 patients without information

BAT26 instability was related to proximal colon tumors ($p < 0.001$), HNPCC patients ($p = 0.002$) and mucinous component of the tumor ($p = 0.007$). BAT26 instability has shown a slight trend towards absence of metastases ($p = 0.082$). The cancer-specific survival was 65% versus 80% for stable and unstable BAT26, respectively. $p = 0.2287$).

DISCUSSION

The molecular profile of CRC is likely to be a determinant of clinical outcome. CRC MMR-deficient and MMR-competent have significant differences between their biology.¹³

Emterling et al¹⁴ have detected MSI in 13% of 438 CRC cases using the marker BAT26 alone and the rate was the same or similar to most previous studies of unselected or sporadic CRC using a panel of 5 markers, as suggested by Bethesda criteria.⁹ Other authors have shown that BAT26 alone can constitute a specific and sensitive tool for identifying tumors with MSI with a certainty of 86% to 99.4%.^{15,16}

Some clinicopathological characteristics of the CRC patients in the present study were significantly correlated to BAT26 alteration: proximal location of the tumor in the colon, Amsterdam criteria for HNPCC patients, poor differentiation and mucinous cell component. Lim SB et al¹⁷ have shown similar results regarding proximal tumor location and poor histological differentiation. The relationship with proximal location and poor differentiation has been reported in other studies¹⁷⁻¹⁹. Some authors have reported relationships between younger age and female gender and MSI^{20,21}, but in the present study we have not found such correlation. The relationship between HNPCC and MSI (panel of 5 markers) is widely known²², but our results have indicated that, when BAT26 is altered alone, the same association can be demonstrated. Wu AH et al²³, in a MSI analysis of 323 sporadic colon cancer cases using 10 microsatellite markers have shown a very high specificity for identifying MSI-H tumors for a number of histopathologic characteristics, including mucinous cell component.

Many studies have found that MSI (panel of 5 markers) is related to better survival rates in CRC patients^{5,7}. The results of the present study have shown that the survival rates had a trend to be better in altered BAT26 CRC cases,

although with no statistical significance (Figure 1), probably due to the small number of cases, resulting in an insufficient statistical power.

Samowitz et al²⁴ have performed a population-based study with more than 1,000 individuals with sporadic colon cancer. They have shown a relationship between MSI and better prognosis, independently of other pathological findings. This population-based study has reported that most of the reduction in risk of cancer death associated with MSI has occurred in patients with positive lymph nodes. Some authors have suggested that the better survival associated to MSI has occurred due to chemotherapy²⁵, whereas other studies have not found the same relationship.²⁶

In conclusion, understanding differences in the natural history of tumors arising from the same tissue of origin provides an important clue to clarify molecular and cell biological influences on tumor initiation and progression. CRC is an excellent model to investigate this process and its relationship with potential prognostic factors. Furthermore, CRC has been the subject of various research projects on carcinogenesis. MSI is one of these streams, and BAT26 alone should be seen just as a part of this process, but the results presented here have shown that it could be an important part in this complex puzzle.

REFERENCES

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Assistência à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 1999. Rio de Janeiro: INCA; 1999.
2. Greenlee RT, Murray T, Bolden S, Wingo PA. Cancer Statistics, 2000. *CA Cancer J Clin* 2000; 50:7-33.
3. Lynch HT, Smyrk T. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome). an updated review. *Cancer* 1996; 78:1149-67.
4. Rossi BM, Pinho M. Tumores colorretais hereditários. In: Rossi BM, Pinho M, editors. *Genética e biologia molecular para o cirurgião*. São Paulo: Lemar; 1999. p.173-200.
5. Jass JR. Towards a molecular classification of colorectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 1999; 14:194-200.
6. Goel A, Arnold CN, Boland CR. Multistep progression of colorectal cancer in the setting of microsatellite instability: new details and novel insights. *Gastroenterology* 2001; 121:1497-502.
7. Gryfe R, Gallinger S. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and colorectal cancer. *Surgery* 2001; 130:17-21.
8. Feeley KM, Fullard JF, Heneghan MA, Smith T, Maher M, Murphy RP, et al. Microsatellite instability in sporadic colorectal carcinoma is not an indicator of prognosis. *J Pathol* 1999; 188:14-7.

9. Rodriduez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute workshop om hereditary nonpolyposis colorectal cancer síndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89:1758-62.
10. Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Ruschoff J, et al. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. *Cancer Res* 1997; 57:4749-56.
11. Rossi BM, Lopes A, Ferreira FO, Rossi BM, Nakagawa WT, Ferreira FO, et al. *hMLH1* and *hMSH2* gene mutation in Brazilian Families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002; 9:555-61.
12. Alazzouzi H, Domingo E, Gonzalez S, Blanco I, Armengol M, Espin E, et al. Low levels of MSI characterize MLH1 and MSH2 HNPCC Carriers before tumor diagnosis. *Hum Mol Genet* 2005; 14:235-9.
13. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 2002; 347:1999-2009.
14. Cravo M, Lage P, Albuquerque C, Chaves P, Claro I, Gomes T, et al. BAT26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *J Pathol* 1999; 188:252-7.
15. Gafa R, Maestri I, Matteuzzi M, Santini A, Ferretti S, Cavazzini L, et al. Sporadic colorectal adenocarcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer* 2000; 89:2025-37.
16. Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, Hamelin R, et al. BAT26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* 1997; 57:300-3.
17. Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993; 260:816-9.
18. Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, et al. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. *N Engl J Med* 2000; 342:69-77.
19. Lothe RA, Peltomaki P, Meling GI, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Pylkkanen L, et al. Genomic instability in colorectal cancer: relationship to clinicopathological variables and family history. *Cancer Res* 1993; 53:5849-52.
20. Johannsdottir JT, Bergthorsson JT, Gretardottir S, Kristjansson AK, Ragnarsson G, Jonasson JG, et al. Replication error in colorectal carcinoma: association with loss of heterozygosity at mismatch repair loci and clinicopathological variables. *Anticancer Res* 1999; 19:1821-6.
21. Elsaleh H, Joseph D, Grieu F, Zeps N, Spry N, Iacopetta B. Association of tumour site and sex with survival benefit from adjuvant chemotherapy in colorectal cancer. *Lancet* 2000; 355:1745-50.
22. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96:261-8.
23. Wu AH, Shibata D, Yu MC, Lai MY, Ross R. Dietary heterocyclic amines and microsatellite instability in colon adenocarcinomas. *Carcinogenesis* 2001; 22:1681-4.
24. Samowitz WS, Curtin K, Ma KN, Schaffer D, Coleman LW, Leppert M, et al. Microsatellite instability in sporadic colon cancer is associated with an improved prognosis at population level. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2001; 10:917-23.
25. Elsaleh H, Iacopetta B. Microsatellite instability is a predictive marker for survival benefit from adjuvant chemotherapy in a population-based series of stage III colorectal carcinoma. *Clin Colorectal Cancer* 2001; 1:104-9.
26. Halling KC, French AJ, McDonnell SK, Burgart LJ, Schaid DJ, Peterson BJ, et al. Microsatellite instability and 8p allelic imbalance in stage B2 and C colorectal cancers. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:1295-303.

ANEXO 8

Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer

CHARLES ANACLETO¹, BENEDITO ROSSI², ADEMAR LOPES², FERNANDO A. SOARES²,
JOSÉ CLÁUDIO C. ROCHA², OTÁVIA CABALLERO³, ANAMARIA A. CAMARGO³,
ANDREW J.G. SIMPSON³ and SÉRGIO D.J. PENA¹

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte;

²Hospital do Câncer A.C. Camargo; ³Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, São Paulo, Brazil

Received July 5, 2004; Accepted August 18, 2004

Abstract. Cancers often exhibit aberrant methylation of gene promoter regions associated with loss of tumor suppressor and/or DNA repair gene function. Such methylation constitutes an excellent marker for the molecular detection of micro-metastases and the diagnosis of tumor recurrences. We have developed a multiplex methylation-specific PCR (MSP) procedure for rapid and simultaneous assessment of the methylation of 5 loci: the tumor suppressor genes *p16^{INK4a}*, death-associated protein kinase (*DAPK*) and *p14^{ARF}*, and the DNA repair genes *hMLH1* and O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (*MGMT*). This multiplex test uses one single PCR reaction and only one electrophoretic run. In 98 samples of colorectal cancer studied, methylation of *MGMT*, *DAPK*, *p16*, *hMLH1* and *p14* was present in 31, 20, 17, 16 and 14% of tumors, respectively. In 58% of the tumors at least one methylated gene was found. This multiplex MSP constitutes a simple and inexpensive method for screening of molecular signatures in colorectal cancer and can be used profitably before employing more expensive and complex techniques such as microarray testing.

Introduction

Colorectal cancer (CRC) is a common malignancy that is expected to afflict approximately 106,000 people and to cause 57,000 deaths in the United States in 2004 (1). Extensive molecular analyses have established that colorectal cancers develop as a multistep process involving the accumulation of specific defects in oncogenes, tumor suppressors and DNA repair genes (2). The latter two categories of genes can be

inactivated by genetic and/or epigenetic processes. Cancer cells exhibit global hypomethylation of their genome accompanied, somewhat paradoxically, by gene-specific aberrant hypermethylation of CpG island in the promoter region of tumor suppressor genes and/or DNA repair genes, leading to loss of transcription (3-5).

Hypermethylation of the promoter region of specific genes can be profitably used as a molecular marker of cancer cells in the detection of micrometastases, diagnosis of recurrences and even as a screening tool for discovering primary tumors (6-8). An advantage of DNA methylation is that it constitutes a positive and stable marker that cannot be masked by the presence of normal tissues and thus offers extraordinary sensitivity in cancer detection through the use of methylation-specific PCR (9).

To take advantage of the utility of DNA methylation as a colorectal cancer cell marker, we should have a standard set of gene targets that is able to identify a high proportion of tumors. We here show that with the study of only 5 loci (*p16*, *hMLH1*, *MGMT*, *DAPK* and *p14*) we can detect aberrant methylation in 58% of colorectal tumors. For diagnostic simplicity and increased efficiency we developed a multiplex PCR amplification procedure that assays the state of methylation of these 5 loci in a single PCR reaction and a single electrophoretic run.

Materials and methods

Sample collection and nucleic acid isolation. Tumor samples from 98 patients diagnosed with colorectal cancer were collected at the A.C. Camargo Cancer Hospital, São Paulo, Brazil. Informed consent was obtained from all patients and this research was approved by the Research Ethics Committee of the A.C. Camargo Hospital and the Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch. In 30 of the patients we also obtained matching normal colon tissue. The samples were frozen and stored in liquid nitrogen immediately after collection. Before molecular analyses, H&E-stained sections from each tumor sample were histologically examined, and only those that were micro-dissected to contain >70% neoplastic cells were used for analysis. DNA was prepared from micro-dissected tissue by digestion with pronase in 1%

Correspondence to: Dr Sérgio D.J. Pena, Departamento de Bioquímica, ICB-UFMG, Caixa Postal 486, 30161-970 Belo Horizonte, MG, Brazil
E-mail: spena@dcc.ufmg.br

Key words: methylation, multiplex, PCR, cancer, colorectal

Table I. Primer sequences, primer concentrations and amplicon sizes of the MSP multiplex reaction.

Locus	Primer sequence (5'→3')	Final primer concentration (mM)	Product size (bp)
<i>p16^{INK4a}</i>	M ^a : Upper: TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC	0.13	234
	M: Lower: CCACCTAAATCGACCTCCGACCG		
	U ^b : TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT	0.09	151
	U: CAACCCCAAACCACAACCATAA		
<i>p14^{ARF}</i>	M: TTTTTTTTTTGTGTAAAGGGCGGCGTAGC M: AAAACCCCTCACTCGCGACGA	0.13	132
<i>h-MHL1</i>	M: GTTGAAGGAAGAACGTGAGTAC M: GAATAACCCCTACCACGAACG	0.19	121
<i>DAPK</i>	M: GGATAGTCGGATCGAGTTAACGTC M: CCTCCCAAACGCCGA	0.25	98
<i>MGMT</i>	M: TTTCGACGTTCTGATGGTTTTCGC M: GCACTCTTCCGAAAACGAAACG	0.25	81

^aM, methylated-specific primers; U, unmethylated-specific primers. ^bThis unmethylated primer pair was included to provide an internal control for the PCR amplification.

SDS, followed by standard phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation (10).

Bisulfite-PCR and methylation-specific PCR (MSP). Methylation-specific PCR (MSP) is based on the chemical modification of genomic DNA with sodium bisulfite, which converts unmethylated cytosines (but not methylated cytosines) to uracil. Specific primers are then designed to distinguish between the sequence differences produced with methylated and unmethylated DNA in methylation-specific PCR (11). We thus studied the methylation status of the following loci: *p16*, *hMLH1*, *DAPK*, *p14*, and *MGMT*. Briefly, 1 µg of genomic DNA was denatured with NaOH (final concentration, 0.2 M), and 10 mM hydroquinone (Sigma). Sodium-bisulfite pH 5.0 (concentration, 3M, Sigma) was added to a final volume of 300 ml and the mixture was incubated at 50°C for 16 h. The modified DNA was then purified using the Wizard DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI, USA), followed by precipitation with ethanol.

Simplex methylation-specific PCR. The primers and thermal cycle conditions for methylation-specific PCR of *p16*, *hMLH1*, *DAPK*, *p14*, and *MGMT* were obtained from the literature (11-14). The PCR mixture contained bisulfite-modified DNA, specific primers (final concentration, 0.5 mM each per reaction), 1 unit of Taq polymerase (Phoneutria, Belo Horizonte, Brazil) and deoxynucleotide triphosphates (0.2 mM), in a 10 mM Tris-HCl buffer pH 8.4, containing KCl 50 mM, 10 mM, 0.1% Triton X-100 and 5 mM MgCl₂. Reactions were hot-started at 95°C for 5 min before the addition of polymerase. Amplification was carried out in a PTC100 MJ Research Inc. Thermal Cycler. About 10 µl of the amplified products were subjected to electrophoresis on 6% acrylamide gels, TBE

buffer 1X, 8V/cm for 120 min and were visualized by silver staining (15).

Multiplex methylation-specific PCR. To detect simultaneously methylation in all 5 loci, we developed a multiplex MSP procedure based on a single PCR reaction and electrophoretic run. Primer sequences of all genes, primer concentrations and amplicon sizes are shown in Table I. The multiplex PCR reaction worked best with AmpliTaq Gold (final concentration, 0.25 u) in its buffer and with the addition 1 M betaine as enhancer. The total volume of the PCR mixtures was 5 µl. The thermal profile consisted of denaturation at 95°C for 30 sec, stepdown at 64°C to 59°C (-2°C each 3 cycles) for 30 sec, 72°C for 30 sec for 3 cycles, 95°C for 30 sec, 60°C for 30 sec, 72°C for 30 sec, 30 cycles, immediately followed by a final extension of 72°C for 10 min. About 3 µl of the amplified product were subjected to electrophoresis on 6% acrylamide gels and visualized by silver staining (15).

Results

Multiplex methylation-specific PCR. We developed successfully a rapid multiplex MSP for the simultaneous assessment of the methylation status at all 5 loci. For all loci, we initially used primer sequences available from the literature (11-14). However, in the development of the multiplex we noticed that the forward primer of *p16* showed complementarity to an *hMLH1* primer and was replaced by another forward primer that had been described by Herman *et al* (11). We also had to increase the *p14* amplicon by 10 pb with the addition of a thymine tail in the forward primer, to increase its separations from the product of *hMLH1*. We used the amplification product of a 151 base pair fragment of the

Figure 1. Silver-stained polyacrylamide gel of the products of the multiplex methylation-specific PCR in 12 colorectal cancers (lanes 8-19), 5 normal colonic tissue samples (lanes 3-7), a pool of several tumors (lane 20) and a blank control (lane 2). In the pool (lane 20) 6 bands are clearly visualized and are, from smaller to larger, *MGMT*, *DAPK*, *hMLH1*, *p14*, internal control (non-methylated band of *p16*) and *p16*. The normal tissue samples (lanes 3-7) show only the internal amplification control. Tumors samples show methylated bands in variable number, ranging from 1-4.

unmethylated promoter of *p16* as an internal-positive control to avoid false negative results (Fig.1). The sequence and concentrations of the primers employed as well as the size of the amplicons are shown in Table I.

Representative examples of results of the multiplex reaction are shown in Fig. 1. In all tumors without methylation at the 5 loci tested, only the internal control PCR product was visualized (Fig. 1, lanes 3-8). In methylated tumors 1-4 bands were seen in addition to the positive control (Fig. 1, lanes 9-19). We examined all 98 tumors with the simplex and multiplex reactions and found 100% concordance of results.

Frequency of methylation in primary colon cancer and their corresponding non-malignant tissues. We used the newly developed multiplex methylation-specific PCR (MSP) to determine the frequency of methylation of *p16*, *hMLH1*, *DAPK*, *MGMT* and *p14* in 98 microdissected primary colon cancers. Aberrant methylation was not seen at any of these loci in 30 non-malignant colon samples. The unmethylated form of all genes was detected in 100% of samples in both tumors and non-malignant tissues. This was not unexpected, because all the tumor specimens contained a small proportion of normal cells. Moreover, some loci may be heterozygous for methylation and thus possess a non-methylated allele. The most commonly methylated locus studied was *MGMT* (30/98; 31%), followed by *DAPK* (20/98; 20%), *p16* (17/98; 17%), *hMLH-1* (16/98; 16%) and *p14* (14/98; 14%). These percentages are within the range found in the literature for each locus. Altogether, we found at least one methylated promoter region in 58% (57/98) of the tumors.

Discussion

In 1994, Hayashi *et al* (16) developed a technique called MASA (mutant-allele-specific amplification) for detecting, at the DNA level, micrometastases of colorectal cancers in lymph nodes that were histologically diagnosed as negative. The method was based on first identifying *K-ras* and *p53* mutations in primary tumors and then designing PCR primers specifically to only amplify mutant molecules in order to examine regional lymph nodes for molecular evidence of metastases. In a clinical study, they used MASA to examine 120 primary tumors, 71 of which (59%) had *K-ras* and/or *p53* mutations (17). They examined regional lymph nodes by mutation-specific PCR and found 37 positive and 34 negative.

Among the patients with positive lymph nodes there was a recurrence rate of 73% within 5 years while among those with negative lymph nodes the recurrence was zero. These enticing results stimulated considerable interest in molecular detection of metastases. Indeed, Liefers *et al* (18), using RT-PCR of carcinoembryonic antigen, confirmed the clinical usefulness of the molecular detection of metastases in establishing a prognosis and orienting treatment in colorectal cancer. Sanchez-Cespedes *et al* (6) expanded the MASA approach by adding methylation-specific PCR of *p16* to *K-ras* and/or *p53* mutations and thus increased the proportion of primary tumors with recognizable molecular signatures to 76%. Because MASA depends on very rapidly finding the specific somatic mutations present in a cancer and quickly designing and synthesizing primers for the specific diagnosis, it is work-intensive and cumbersome for routine clinical use. On the other hand, the constant position of the abnormal DNA methylation in genes of interest provides a much simpler and direct means to characterize a molecular signature of a tumor and to use it as a marker for detecting metastases and recurrences (2). Moreover, the DNA providing the molecular information is much more stable than the mRNA needed for RT-PCR protocols (19).

More recently, advances in microarray technology have permitted the development of highly parallel assays for detection of methylation of up to 8,000 CpG islands (20) or for diagnosis of most *p53* mutations as a preliminary step for MASA (21). However, these techniques need relatively complex microarray equipment and expertise not available at most clinical centers.

We report here the development of an extremely simple multiplex methylation-specific amplification procedure for the simultaneous evaluation of methylation in the promoter region of 5 loci: *p16*, *hMLH1*, *MGMT*, *p14* and *DAPK*. The genes that were chosen as targets are the ones that have been found most often methylated in colorectal cancer (12,22,23). In a panel of 98 primary colorectal cancers we found 58% of tumors with at least one methylated gene. The sensitivity of our multiplex procedure was 0.58 (95% confidence interval 0.48-0.68) and the specificity was 1.00 (95% confidence interval 0.86-1.00) since no false positives were found in 30 non-malignant colorectal tissues. After a tumor is found to have methylation of one of the loci, sensitive testing for detection of metastases and diagnosis of recurrences can be safely achieved with the appropriate simplex procedure. We

conclude that the multiplex MSP described here constitutes a rapid, efficient and simple cost-effective method for the screening of molecular signatures in colorectal cancer and can be used profitably before employing more expensive and complex techniques such as microarray testing. Moreover, since the genes examined in the multiplex are frequently methylated in other malignancies, such as lung cancer, cancer of the uterus and leukemias (5,24), the test may be useful in the clinical evaluation of these, and perhaps other tumors as well.

Acknowledgements

We are grateful to Rosiane M.R. Faleiro for her statistical help and Neuza Antunes Rodrigues, Kátia Barroso Gonçalves and Mirian Rodrigues Costa for their technical support. This study was supported by Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP).

References

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ and Thun MJ: American Cancer Society. Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* 54: 8-29, 2004.
2. Herman JG and Baylin SB: Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* 349: 2042-2054, 2003.
3. Baylin SB and Herman JG: DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet* 16: 168-174, 2000.
4. Esteller M: CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 21: 5427-5440, 2002.
5. Esteller M, Corn PG, Baylin SB and Herman JG: A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* 61: 3225-3229, 2001.
6. Sanchez-Cespedes M, Esteller M, Hibi K, Cope FO, Westra WH, Piantadosi S, Herman JG, Jen J and Sidransky D: Molecular detection of neoplastic cells in lymph nodes of metastatic colorectal cancer patients predicts recurrence. *Clin Cancer Res* 5: 2450-2454, 1999.
7. Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J and Sidransky D: Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* 91: 332-339, 1999.
8. Palmisano WA, Divine KK, Saccomanno G, Gilliland FD, Baylin SB, Herman JG and Belinsky SA: Predicting lung cancer by detecting aberrant promoter methylation in sputum. *Cancer Res* 60: 5954-5959, 2000.
9. Esteller M and Herman JG: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 196: 1-7, 2002.
10. Freitas RN, Brasileiro-Filho G, Silva ME and Pena SD: Bracken fern-induced malignant tumors in rats: absence of mutations in p53, H-ras and K-ras and no microsatellite instability. *Mutat Res* 499: 189-196, 2002.
11. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD and Baylin SB: Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 9821-9826, 1996.
12. Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB and Herman JG: Inactivation of the DNA repair gene O6-methylguanine-DNA methyltransferase by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* 59: 793-797, 1999.
13. Katzenellenbogen RA, Baylin SB and Herman JG: Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* 93: 4347-4353, 1999.
14. Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB and Herman JG: Hypermethylation-associated inactivation of p14^{ARF} is independent of p16^{INK4a} methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* 60: 129-133, 2000.
15. Santos FR, Pena SD and Epplen JT: Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum Genet* 90: 655-656, 1993.
16. Hayashi N, Arakawa H, Nagase H, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Takano S, Ogawa M and Nakamura Y: Genetic diagnosis identifies occult lymph node metastases undetectable by the histopathological method. *Cancer Res* 54: 3853-3856, 1994.
17. Hayashi N, Ito I, Yanagisawa A, Kato Y, Nakamori S, Imaoka S, Watanabe H, Ogawa M and Nakamura Y: Genetic diagnosis of lymph-node metastasis in colorectal cancer. *Lancet* 345: 1257-1259, 1995.
18. Liefers GJ, Cleton-Jansen AM, van de Velde CJ, Hermans J, van Krieken JH, Cornelisse CJ and Tollenaar RA: Micro-metastases and survival in stage II colorectal cancer. *N Engl J Med* 339: 223-228, 1998.
19. Cottrell SE and Laird PW: Sensitive detection of DNA methylation. *Ann NY Acad Sci* 983: 120-130, 2003.
20. Yan PS, Efferth T, Chen HL, Lin J, Rodel F, Fuzesi L and Huang TH: Use of CpG island microarrays to identify colorectal tumors with a high degree of concurrent methylation. *Methods* 27: 162-169, 2002.
21. Takahashi Y, Ishii Y, Nagata T, Ikarashi M, Ishikawa K and Asai S: Clinical application of oligonucleotide probe array for full-length gene sequencing of TP53 in colon cancer. *Oncology* 64: 54-60, 2003.
22. Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB and Issa JP: CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8681-8686, 1999.
23. Yamaguchi S, Asao T, Nakamura J, Ide M and Kuwano H: High frequency of DAP-kinase gene promoter methylation in colorectal cancer specimens and its identification in serum. *Cancer Lett* 194: 99-105, 2003.
24. Uehara E, Takeuchi S, Tasaka T, Matsushashi Y, Yang Y, Fujita M, Tamura T, Nagai M and Koeffler HP: Aberrant methylation in promoter-associated CpG islands of multiple genes in therapy-related leukemia. *Int J Oncol* 23: 693-696, 2003.

ANEXO 9

Colorectal Cancer “Methylator Phenotype”: Fact or Artifact?¹

Charles Anacleto*, Andréia M. Leopoldino*, Benedito Rossi[†], Fernando A. Soares[†], Ademar Lopes[†], José Cláudio C. Rocha[‡], Otávia Caballero[‡], Anamaria A. Camargo[‡], Andrew J. G. Simpson[‡] and Sérgio D. J. Pena*

*Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 31270-910 Brazil; [†]Hospital A. C. Camargo, São Paulo, SP, Brazil; [‡]Instituto Ludwig de Pesquisa Sobre o Câncer, São Paulo, SP, Brazil

Abstract

It has been proposed that human colorectal tumors can be classified into two groups: one in which methylation is rare, and another with methylation of several loci associated with a “CpG island methylated phenotype (CIMP),” characterized by preferential proximal location in the colon, but otherwise poorly defined. There is considerable overlap between this putative methylator phenotype and the well-known mutator phenotype associated with microsatellite instability (MSI). We have examined hypermethylation of the promoter region of five genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*) in 106 primary colorectal cancers. A graph depicting the frequency of methylated loci in the series of tumors showed a continuous, monotonically decreasing distribution quite different from the previously claimed discontinuity. We observed a significant association between the presence of three or more methylated loci and the proximal location of the tumors. However, if we remove from analysis the tumors with *hMLH1* methylation or those with MSI, the significance vanishes, suggesting that the association between multiple methylations and proximal location was indirect due to the correlation with MSI. Thus, our data do not support the independent existence of the so-called methylator phenotype and suggest that it rather may represent a statistical artifact caused by confounding of associations.

Neoplasia (2005) 7, 331–335

Keywords: CpG methylation, phenotype, colorectal, cancer, microsatellite instability.

loss of the mismatch repair system (germline and/or somatic), leading to accelerated accumulation of gene mutations in critical target genes and progression to malignancy. The distinction between these pathways seems to be more than academic because there is evidence that the tumors emerging from the mutator pathway have a specific “mutator phenotype” that includes preferential localization in the right colon, undifferentiated histology, lymphocyte infiltration, a better prognosis, and resistance to adjuvant therapy with 5-fluorouracil [3–5].

Recently, it has been discovered that in either pathogenetic pathways, loss of activity of key genes may occur through epigenetic, rather than genetic, means [6]. Indeed, although lack of expression of mismatch repair genes is generally found in sporadic tumors with MSI, the majority of such tumors does not show mutations in these DNA repair genes [7–9]. In fact, methylation of *hMLH1* is the single most common recognizable form of MSI in sporadic colorectal tumors [10]. Recent work has shown that loss of tumor-suppressor and/or DNA repair gene function by promoter methylation can occur in many different genes in sporadic CRCs [11]. In 1999, Toyota et al. studied human CRC with a technique which they called “methylated CpG island amplification” and observed that tumors could be classified in two very distinct groups: one with simultaneous methylation of several loci, and another in which methylation of these loci was very rare. Moreover, they noted that a large proportion of proximal tumors belonged to the former group, and they proposed the existence of a “CpG island methylated phenotype (CIMP).” They also observed that CIMP⁺ tumors often also exhibited *hMLH1* methylation and MSI, and they did remark that MSI was also correlated with proximal tumors but failed to point out that this chain of associations might lead to confounding of variables [12].

Introduction

Two different major pathogenetic mechanisms have been proposed for the development of colorectal cancers (CRCs) [1]. The first, so-called “classic pathway,” seems to be the most common and depends on multiple additive mutational events (germline and/or somatic) in tumor-suppressor genes and oncogenes, frequently involving chromosomal deletions in key genomic regions [2]. However, the “mutator pathway,” operationally recognizable by the presence of microsatellite instability (MSI), depends on early mutational

Abbreviations: CRC, colorectal cancer; CIMP, CpG island methylated phenotype; MSI, microsatellite instability; MSP, methylation-specific PCR

Address all correspondence to: Sérgio D. J. Pena, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas—UFMG, Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brazil. E-mail: spena@dcc.ufmg.br

¹This work was supported by the Conselho Nacional de Pesquisas (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and Fundação de Amparo a Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP).

Received 15 July 2004; Revised 21 November 2004; Accepted 23 November 2004.

Copyright © 2005 Neoplasia Press, Inc. All rights reserved 1522-8002/05/\$25.00
DOI 10.1593/neo.04502

We have studied promoter methylation of the tumor-suppressor genes *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}*, the apoptosis-associated gene death-associated protein kinase (*DAPK*), and the DNA repair genes *hMLH1* and *O⁶-methylguanine-DNA-methyltransferase (MGMT)*, and also analyzed MSI in 106 human colorectal adenocarcinomas. We did not find any discontinuities in the distribution of the number of methylated genes in CRC. Moreover, after we removed tumors that had MSI from the statistical analysis, there was no longer a significant association between multiple methylated loci and proximal tumor location. Thus, our data do not support the existence of the so-called methylator phenotype and suggest that it rather represents a statistical artifact caused by confounding of associations.

Materials and Methods

Sample Collection and Nucleic Acid Isolation

Primary tumor samples from 106 patients diagnosed with CRC were collected at the A. C. Camargo Cancer Hospital (São Paulo, Brazil). Informed consent was obtained from all patients, and this research was approved by the Research Ethics Committee of the A. C. Camargo Hospital and the Ludwig Institute for Cancer Research (São Paulo, Brazil). In 30 of the patients, we also obtained matching normal colon tissue. To avoid selection bias, the samples were collected on sequential surgical cases of CRC. Immediately after collection, the samples were snap-frozen in liquid nitrogen and kept as part of a tumor bank. For this study, H&E-stained sections from each tumor sample were histologically examined, and only those that were microdissected to contain more than 70% neoplastic cells were used for analysis. DNA was prepared from microdissected tissue by digestion with pronase in 1% SDS, followed by standard phenol-chloroform extraction and ethanol precipitation [13]. In all patients, we obtained medical information on the nature of the cancer, patient sex and age, tumor location, histologic features, and clinical evolution.

Bisulfite Treatment and Methylation-Specific PCR (MSP)

MSP is based on the chemical modification of genomic DNA with sodium bisulfite, which converts unmethylated cytosines (but not methylated cytosines) to uracil. Specific primers are then designed to distinguish between the sequence differences produced with methylated and unmethylated DNA in MSP [14]. We studied the methylation status of the following loci: *DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*. Briefly, 1 µg of genomic DNA was denatured with NaOH (final concentration, 0.2 M), and 10 mM 6-hydroquinone (Sigma, St. Louis, MO). Sodium bisulfite, pH 5.0 (Sigma), was added to a final concentration of 3 M and the mixture was incubated at 50°C for 16 hours. The modified DNA was then purified using the Wizard DNA purification kit (Promega Corporation, Madison, WI), followed by precipitation with ethanol.

The primers and thermal cycle conditions for MSP of *DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}* were as

detailed elsewhere [14–17]. The PCR mixture contained bisulfite-modified DNA, specific primers (final concentration, 0.6 µM each per reaction), 1 U of Taq polymerase (Phoentria, Belo Horizonte, Brazil), and deoxynucleotide triphosphates (1.25 mM) in 1% Triton X-100, 500 mM KCl, 15 mM MgCl₂, and 100 mM Tris-HCl (pH 8.4). Reactions were maintained at 95°C for 5 minutes before the addition of polymerase. Amplification was carried out using a PTC100 MJ Research, Inc. Thermal Cycler (Watertown, MA). About 10 µl of the amplified products was electrophoresed on 6% acrylamide gels and visualized by silver staining.

MSI

The Bethesda consensus panel, composed of two mononucleotide repeat microsatellites (*BAT25* and *BAT26*) and three dinucleotide repeat microsatellites (*D2S123*, *D5S346*, and *D17S250*), was used to evaluate MSI [18]. The mononucleotide microsatellite BAT-26, which is part of the panel, has been reported to have close to 100% sensitivity and specificity as a marker of this phenomenon [19,20]. As an additional criterion for MSI, we also utilized a battery of nine tetranucleotide microsatellite loci and one trinucleotide microsatellite [21].

Statistical Analysis

The 2 × 2 cross-categorized frequency data were tested by Fisher's exact test using the online facility at <http://faculty.vassar.edu/lowry/VassarStats.html>. A probability value of < .05 was considered significant, and we applied the Bonferroni correction for multiple comparisons [22].

Results

Frequency of Methylation in Primary Colorectal Tumors and Corresponding Nonmalignant Tissues

We used MSP to determine the frequency of methylation of *DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}* in 106 microdissected primary CRCs. These loci were chosen because they are among the most frequently methylated in CRC [23]. No aberrant methylation of any of these loci was detected in 30 samples of nonmalignant colon tissues. However, a total of 109 methylation events was detected in 106 tumors. In addition, the unmethylated form of all genes was detected in 100% of samples in both tumors and nonmalignant tissues. This was not unexpected because, inevitably, all tumor specimens contain a small proportion of normal cells. Moreover, some loci may be heterozygous for methylation and thus possess a nonmethylated allele. As shown in Figure 1, the most frequently methylated locus was *MGMT* (32/109; 29.4%), followed by *DAPK* (21/109; 19.3%), *p16^{INK4a}* (20/109; 18.3%), *hMLH1* (19/109; 17.4%), and *p14^{ARF}* (17/109; 15.6%). We identified at least one methylated promoter region in 58.5% (62/106) of the tumors (Figure 1). Overall, 41.5% (44/106) of the tumors had no methylated genes, 30.2% (32/106) had only one methylated gene, 16.0% (17/106) had two methylated genes, 8.5% (9/106) had three methylated genes, and 4% (4/106) had four methylated

Figure 1. Hypermethylation of the promoter region of five genes (DAPK, MGMT, hMLH1, p16^{INK4a}, and p14^{ARF}) in 106 microdissected primary CRCs. Each column is a different tumor. Back squares indicate methylated loci. The top row shows (marked with an X) tumors with MSI (MSI⁺).

genes (Figure 2). We checked all loci for pairwise association using Fisher's exact test. The only significant association found, following application of the Bonferroni correction for multiple comparisons, was between the methylation of *p16^{INK4a}* and *p14^{ARF}*. However, this finding was not pursued further because numerous other studies have previously tested the possibility of this association and ruled it out [17,24,25].

MSI

We scored tumors for MSI (MSI⁺) following the Bethesda guidelines [18] (i.e., if there were alterations in two or more of the mononucleotide repeat microsatellites *Bat25* and *Bat26*, or the dinucleotide repeat microsatellites *D2S123*, *D5S346*, and *D17S250*). As expected from previous reports [19,20], deletions in the *BAT26* were seen in all tumors with instability. Moreover, we also looked for extra alleles in a battery of one trinucleotide and nine tetranucleotide microsatellite loci [21]. There was complete concordance between the two criteria. Fourteen of 106 tumors (13.2%) displayed MSI. This value is compatible with that found in other studies [26,27]. As expected, the presence of MSI was very highly associated with the location of the tumor proximal to the splenic flexure of the colon (Table 1). However, it showed no significant correlation with recurrence within 3 years of diagnosis (Table 1).

Association between Methylation and Clinical Features

We searched for associations between the number of loci found to be methylated and some clinical characteristics of the tumors (i.e., we tested if a “methylator phenotype” could be recognized). Because we had not found any discontinuities in the distribution of the number of methylated loci per tumor (Figure 1) as previously claimed by Toyota et al. [12,28], we lacked a clear criterion for defining a “high-methylation group.” Thus, we did the analysis using as “high-methylation group” the category of three or more methylated loci (criterion 1) and repeated it with the category of two or more methylated loci (criterion 2). We used Fisher’s exact test to assess, for each of the categories of ≥ 2 and ≥ 3 methylated loci, an association with location of the tumor (distal *versus* proximal colon), recurrence within 3 years of diagnosis, and MSI. We found no significant association of the level of methylation with recurrence rate or with MSI (Table 1). However, tumor location was significantly associated with three or more methylated loci ($P = .011$) and also with two or more methylated loci ($P = .029$), although the former was no longer significant after applying the Bonferroni correction for multiple comparisons (Table 1). This led us to use Fisher’s exact test to ascertain whether there was

any association between location and methylation at each of the five loci in isolation. There was no association of proximal location with *DAPK*, *MGMT*, *p14^{ARF}*, or *p16^{INK4a}*, but there was a highly significant association with the methylation of *hMHL1* that persisted after application of the Bonferroni correction for multiple contrasts (Table 1). As expected, methylation of *hMHL1* was also highly associated with MSI and with the categories of ≥ 2 and ≥ 3 methylated loci (Table 1).

Discussion

CRC is a common malignancy that is expected to afflict approximately 106,000 people and to cause 57,000 deaths in the United States in 2004 [29]. There is an urgent need for markers that can be used in the establishment of a prognosis and that can guide in choosing the most appropriate treatment. In this sense, the discovery of the “mutator pathway” of CRC, operationally signaled by the presence of MSI (MSI⁺), was a major development. MSI⁺ CRC has characteristic biologic properties that include preferential proximal location, undifferentiated histology, and a relatively better prognosis [3,4]. Recent data suggest that fluorouracil-based adjuvant chemotherapy is of no benefit to patients with MSI⁺ CRC [5]. If these findings are confirmed, there will be a strong case for testing all CRCs for MSI [30].

Hypermethylation of the promoter region of specific genes can be profitably used as a molecular marker of cancer cells in the detection of micrometastases, diagnosis of recurrences, and even as a screening tool for discovering primary tumors [6]. An advantage of DNA methylation is that it constitutes a positive and stable marker that cannot be masked by the presence of normal tissues and thus offers

Figure 2. Bar graph of the proportion of methylated loci in 106 CRCs.

Table 1. Values of *P* (Two-Tailed) from Several Pairwise Comparisons Using Fisher's Exact Test.

	<i>hMLH1</i> Methylation		MSI		Location		Recurrence within 3 Years	
	+	–	+	–	Proximal	Distal	+	–
MSI	+	8	7					
	–	11	80					
	<i>P</i> = .0008*							
Location	Proximal	9	13	Proximal	9	13		
	Distal	8	62	Distal	5	65		
	<i>P</i> = .004*		<i>P</i> = .0005*					
Recurrence within 3 years	+	1	12	+	2	11	+	3
	–	14	60	–	12	62	–	19
	<i>P</i> = .295		<i>P</i> = .652		<i>P</i> = .563			
≥2 Methylated loci	+	14	16	+	7	23	+	10
	–	5	71	–	8	68	–	12
	<i>P</i> = .000006*		<i>P</i> = .086		<i>P</i> = .029		<i>P</i> = .415	
≥3 Methylated loci	+	8	5	+	4	9	+	0
	–	11	82	–	11	82	–	13
	<i>P</i> = .0002*		<i>P</i> = .083		<i>P</i> = .011*		<i>P</i> = .365	

Proximal = proximal to the splenic flexure; Distal = distal to the splenic flexure.

*Statistically significant after Bonferroni correction for multiple comparisons.

extraordinary sensitivity in cancer detection through the use of MSP. Moreover, methylation might provide a new therapeutic target in CRC [6]. It is less clear whether multiple methylations have prognostic value. Toyota et al. [12,28] proposed the existence of a “CIMP” in human CRC, which included simultaneous methylation of several genes, preferential proximal location in the colon, and also an association with MSI. Although several other authors have supported this concept [31–33], the exact nature of such methylator phenotype is still poorly defined [27]. In particular, there is considerable overlap between the well-known phenotype associated with MSI and the proposed methylator phenotype. Because there exists a correlation between multiple methylations and MSI, the possibility of statistical confounding must be considered.

We have examined here the hypermethylation of the promoter region of five genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*) in 106 microdissected primary CRCs. A histogram depicting the frequency of methylated loci in the series of tumors showed a continuous, monotonically decreasing distribution (Figure 2) that was quite different from the discontinuity that had been previously described by Toyota et al. [12]. Our results agree well with other authors who examined large numbers of tumors and who also did not find any discontinuities [27,33]. There was a significant association between the presence of three or more methylated loci and the tumor location proximal to the splenic flexure (Table 1). However, if we removed from analysis the tumors that display *hMLH1* methylation or those with MSI, the significance of association of “high methylation” with location vanishes (*P* = .32 and *P* = .26, respectively). Likewise, the data of Yamashita et al. [27] also show that the significant association observed between “high methylation” and right-side location becomes nonsignificant (after correction for multiple testing) on removal of the MSI⁺ tumors. Thus, it appears that the association of “high methylation” with proximal location is not direct, but indirect, due to correlation with MSI. However, the association of MSI with

location is known to occur very strongly in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), in which 70% of tumors are right-sided [3] and in which methylation is uncommon [10].

In conclusion, our data do not support the existence of a methylator phenotype and suggest that it may represent a statistical artifact caused by confounding with the phenotype of tumors displaying MSI.

Acknowledgements

We are grateful to Glauro Franco (Department of Statistics, Universidade Federal de Minas Gerais) for her invaluable advice and to Rosiane Faleiro for help with the statistical analysis. Neuza Antunes Rodrigues, Kátia Barroso Gonçalves, and Mirian Rodrigues Costa provided expert technical support.

References

- [1] Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, and Perucho M (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* **363**, 558–561.
- [2] Lynch HT and de la Chapelle A (2003). Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* **348**, 919–932.
- [3] Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, and Hamilton SR (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* **260**, 812–816.
- [4] Thibodeau SN, Bren G, and Schaid D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* **260**, 816–819.
- [5] Ribic CM, Sargent DJ, Moore MJ, Thibodeau SN, French AJ, Goldberg RM, Hamilton SR, Laurent-Puig P, Gryfe R, Shepherd LE, et al. (2003). Tumor microsatellite-instability status as a predictor of benefit from fluorouracil-based adjuvant chemotherapy for colon cancer. *N Engl J Med* **349**, 247–257.
- [6] Herman JG and Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med* **349**, 2042–2054.
- [7] Bubb VJ, Curtis LJ, Cunningham C, Dunlop MG, Carothers AD, Morris RG, White S, Bird CC, and Wyllie AH (1996). Microsatellite instability and the role of hMSH2 in sporadic colorectal cancer. *Oncogene* **12**, 2641–2649.
- [8] Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P, Canzian F, Hemminki A, Peltomäki P, Chadwick RB, Kaariainen H, Eskelinen M, Jarvinen H, et al. (1998). Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the

- feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* **338**, 1481–1487.
- [9] Senba S, Konishi F, Okamoto T, Kashiwagi H, Kanazawa K, Miyaki M, Konishi M, and Tsukamoto T (1998). Clinicopathologic and genetic features of nonfamilial colorectal carcinomas with DNA replication errors. *Cancer* **82**, 279–285.
 - [10] Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, and Kolodner R (1997). Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair–defective human tumor cell lines. *Cancer Res* **57**, 808–811.
 - [11] Grady WM and Markowitz SD (2002). Genetic and epigenetic alterations in colon cancer. *Annu Rev Genomics Hum Genet* **3**, 101–128.
 - [12] Toyota M, Ahuja N, Ohe-Toyota M, Herman JG, Baylin SB, and Issa JP (1999). CpG island methylator phenotype in colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**, 8681–8686.
 - [13] Ahrendt SA, Chow JT, Xu LH, Yang SC, Eisenberger CF, Esteller M, Herman JG, Wu L, Decker PA, Jen J, et al. (1999). Molecular detection of tumor cells in bronchoalveolar lavage fluid from patients with early stage lung cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**, 332–339.
 - [14] Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, and Baylin SB (1996). Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 9821–9826.
 - [15] Katzenellenbogen RA, Baylin SB, and Herman JG (1999). Hypermethylation of the DAP-kinase CpG island is a common alteration in B-cell malignancies. *Blood* **93**, 4347–4353.
 - [16] Esteller M, Hamilton SR, Burger PC, Baylin SB, and Herman JG (1999). Inactivation of the DNA repair gene *O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase* by promoter hypermethylation is a common event in primary human neoplasia. *Cancer Res* **59**, 793–797.
 - [17] Esteller M, Tortola S, Toyota M, Capella G, Peinado MA, Baylin SB, and Herman JG (2000). Hypermethylation-associated inactivation of p14(ARF) is independent of p16(INK4a) methylation and p53 mutational status. *Cancer Res* **60**, 129–133.
 - [18] Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, et al. (1998). 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* **58**, 5248–5257.
 - [19] Rampino N, Yamamoto H, Ionov Y, Li Y, Sawai H, Reed JC, and Perucho M (1997). Somatic frameshift mutations in the *BAX* gene in colon cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Science* **275**, 967–969.
 - [20] Hoang JM, Cottu PH, Thuille B, Salmon RJ, Thomas G, and Hamelin R (1997). BAT-26, an indicator of the replication error phenotype in colorectal cancers and cell lines. *Cancer Res* **57**, 300–303.
 - [21] Pena SDJ (1999). Single-tube single-colour multiplex PCR amplification of ten polymorphic microsatellites (ALF10): a new powerful tool for DNA profiling. *Pure Appl Chem* **71**, 1683–1690.
 - [22] Sokal RR and Rohlf FJ (1995). *Biometry*, 3rd ed, p. 887 W. H. Freeman and Co., New York.
 - [23] Esteller M, Corn PG, Baylin SB, and Herman JG (2001). A gene hypermethylation profile of human cancer. *Cancer Res* **61**, 3225–3229.
 - [24] Burri N, Shaw P, Bouzourene H, Sordat I, Sordat B, Gillet M, Schorderet D, Bosman FT, and Chaubert P (2001). Methylation silencing and mutations of the *p14^{ARF}* and *p16^{INK4a}* genes in colon cancer. *Lab Invest* **81**, 217–229.
 - [25] Dominguez G, Silva J, Garcia JM, Silva JM, Rodriguez R, Munoz C, Chacon I, Sanchez R, Carballido J, Colas A, et al. (2003). Prevalence of aberrant methylation of *p14^{ARF}* over *p16^{INK4a}* in some human primary tumors. *Mutat Res* **530**, 9–17.
 - [26] Ward RL, Cheong K, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, and Hawkins NJ (2003). Adverse prognostic effect of methylation in colorectal cancer is reversed by microsatellite instability. *J Clin Oncol* **21**, 3729–3736.
 - [27] Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, and Perucho M (2003). Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* **4**, 121–131.
 - [28] Toyota M, Ohe-Toyota M, Ahuja N, and Issa JP (2000). Distinct genetic profiles in colorectal tumors with or without the CpG island methylator phenotype. *Proc Natl Acad Sci USA* **97**, 710–715.
 - [29] Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, Samuels A, Ward E, Feuer EJ, Thun MJ, and American Cancer Society (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J Clin* **54**, 8–29.
 - [30] de la Chapelle A (2003). Microsatellite instability. *N Engl J Med* **349**, 209–210.
 - [31] van Rijnsoever M, Griew F, Elsaleh H, Joseph D, and Iacopetta B (2002). Characterisation of colorectal cancers showing hypermethylation at multiple CpG islands. *Gut* **51**, 797–802.
 - [32] Whitehall VL, Wynter CV, Walsh MD, Simms LA, Purdie D, Pandeya N, Young J, Meltzer SJ, Leggett BA, and Jass JR (2002). Morphological and molecular heterogeneity within nonmicrosatellite instability high colorectal cancer. *Cancer Res* **62**, 6011–6014.
 - [33] Hawkins N, Norrie M, Cheong K, Mokany E, Ku SL, Meagher A, O'Connor T, and Ward R (2002). CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* **122**, 1376–1387.

ANEXO 10

Relationship of the methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism with microsatellite instability and promoter hypermethylation in sporadic colorectal cancer

Alessandra D. Clarizia¹, Luciana Bastos-Rodrigues¹, Heloisa B. Pena¹, Charles Anacleto¹, Benedito Rossi², Fernando A. Soares², Ademar Lopes², José Cláudio C. Rocha², Otávia Caballero⁴, Anamaria Camargo³, Andrew J.G. Simpson⁴ and Sérgio D.J. Pena¹

¹Departamento de Bioquímica e Imunologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brasil

²Hospital A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil

³Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer, São Paulo, SP, Brasil

⁴Ludwig Institute for Cancer Research, New York, NY, USA

Corresponding author: S.D.J. Pena

E-mail: spena@dcc.ufmg.br

Genet. Mol. Res. 5 (2): 315-322 (2006)

Received January 27, 2006

Accepted March 28, 2006

Published May 17, 2006

ABSTRACT. The methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) C677T polymorphism is associated with the expression of a thermolabile enzyme with decreased activity that influences the pool of methyl-donor molecules. Several studies have reported an association between C677T polymorphism and susceptibility to colorectal cancer (CRC). Considering that methylation abnormalities appear to be important for the pathogenesis of CRC, we examined the correlation between the genotype of the MTHFR C677T polymorphism, hypermethylation of the promoter region of five relevant genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*), and microsatellite instability, in 106 patients with primary CRCs in Brazil. We did not find significant differences in the genotypic fre-

quencies of the MTHFR C677T polymorphism when one or more loci were hypermethylated. However, we did find a significant excess of 677TT individuals among patients with CRC who had microsatellite instability. This strong association was independent of the methylation status of *hMLH1* and of the biogeographical genomic ancestry of the patients. Although the mechanism responsible for the link between the C677T polymorphism and microsatellite instability was not apparent, this finding may provide a clue towards a better understanding of the pathogenesis of microsatellite instability in human colorectal cancer.

Key words: Methylenetetrahydrofolate reductase, MTHFR, C677T polymorphism, Microsatellite instability, Hypermethylation, Colorectal cancer

INTRODUCTION

Colorectal cancer (CRC) is one of the most common human malignancies, being responsible for more than 100,000 cases annually in the United States (Jemal et al., 2004). There is thus an urgent need to identify possible predisposing conditions, to help identify susceptible individuals for clinical surveillance.

One of the possible risk factors recently proposed for CRC is the genotype of the methylenetetrahydrofolate reductase enzyme (MTHFR) C677T polymorphism (reviewed in Sharp and Little, 2004). Such a link is of special interest, because altered patterns of DNA methylation are very common in this malignancy (Herman and Baylin, 2003; Esteller, 2005). For instance, we recently found that at least 58% of human CRCs show hypermethylation of the promoter region of at least one human gene (Anacleto et al., 2005a,b).

In the C677T polymorphism of the MTHFR gene, there is a change from an evolutionary conserved alanine to a valine, resulting in a thermolabile enzyme with low activity (Frosst et al., 1995). Individuals with the 677TT and 677CT genotypes show 30 and 65% activity levels of MTHFR, respectively, compared with the 677CC homozygote (Sharp and Little, 2004). The 677T allele shows geographical variation in frequency, being least frequent in sub-Saharan Africa and more uniformly common in other continents (Botto and Yang, 2000). The 677T allele occurs in the same haplotype background in European, Asian and African individuals, suggesting that it only occurred once in human evolution, probably in Africa, and that it spread due to some yet unknown selective advantage (Rosenberg et al., 2002).

Numerous studies have been done on the association between the C677T polymorphism and susceptibility to CRC, many of them pointing to a lower prevalence of CRC among individuals with the 677TT genotype (Sharp and Little, 2004; Kono and Chen, 2005). There seems to be a dependency on adequate folate status; when the dietary intake is low, since the protective effect of the 677TT genotype is not evident in heavy alcohol drinkers (Bailey, 2003; Sharp and Little, 2004). Nevertheless, several other studies, including some with a large number of patients (Keku et al., 2002), have failed to show any such association.

Two different major pathogenetic mechanisms have been proposed for the development of CRC (Ionov et al., 1993). The first, the so-called "classic pathway", seems to be the most common and depends on multiple additive mutational events (germline and/or somatic) in tumor suppressor genes and oncogenes, frequently involving chromosomal deletions in key genomic regions (Rajagopalan et al., 2003). On the other hand, the "mutator pathway", operationally recognizable by the presence of microsatellite instability, depends on early mutational loss of the mismatch repair system (germline and/or somatic), leading to accelerated accumulation of gene mutations in critical target genes and progression to malignancy (Lynch and de la Chapelle, 2003). The distinction between these pathways seems to be more than academic, since there is evidence that the tumors emerging from the mutator pathway have a specific "mutator phenotype", which includes preferential localization in the right colon, undifferentiated histology, lymphocyte infiltration, and a better prognosis (Aaltonen et al., 1993; Thibodeau et al., 1993). Recently, it has also been discovered that in both of these pathogenetic pathways, loss of activity of key genes can occur through hypermethylation of their promoter region, rather than by genetic means (Herman and Baylin, 2003).

Recently, we examined microsatellite instability (MSI), and hypermethylation of the promoter region of five genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*) in 106 patients with primary colorectal cancers in Brazil (Anacleto et al., 2005a,b). We have now made genetic typing studies of the MTHFR C677T polymorphism in these patients and in a control population.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Primary tumor samples from 106 patients diagnosed with CRC were collected at the A.C. Camargo Cancer Hospital in São Paulo, Brazil. Informed consent was obtained from all patients, and this research was approved by the Research Ethics Committee of the A.C. Camargo Hospital and the Ludwig Institute for Cancer Research, São Paulo Branch. We also obtained matching normal colon tissue from 30 of the patients. To avoid selection bias, the samples were collected from sequential surgical cases of CRC. We also obtained medical information on the nature of the cancer, sex, age, tumor location, histological features, and clinical evolution for each patient. This is an extension of our previous study, which should be consulted for detailed information (Anacleto et al., 2005b). As a control group, we studied 150 healthy individuals from the southeast region of Brazil.

MTHFR genotyping

DNA from CRC cases (normal and tumor tissue) and from control subjects were genotyped for MTHFR C677T by examining polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphisms produced with the *HinfI* restriction enzyme, as described elsewhere (Frosst et al., 1995). The 677T allele creates a *HinfI* restriction site, producing 175- and 23-bp fragments, while there is no cleavage for the 677C allele (which is then identified by a 198-bp fragment). All the samples were scored independently and blindly by two researchers at our laboratory, in order to guarantee the quality of genotyping.

Methylation and microsatellite instability

All samples were studied for methylation of the promoter region of the following genes: *DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*, as described previously (Anacleto et al., 2005b). We also studied MSI in all samples using the Bethesda consensus panel (Boland et al., 1998), composed of two mononucleotide repeat microsatellites (*BAT25* and *BAT26*) and three dinucleotide repeat microsatellites (*D2S123*, *D5S346*, and *D17S250*), also as described elsewhere (Anacleto et al., 2005b).

Genomic ancestry analysis

All cancer samples were submitted to an analysis of biogeographical genomic ancestry. Each sample was independently typed for 40 biallelic short insertion/deletion polymorphisms (indels) as described previously (Bastos-Rodrigues et al., 2006). Amplicons were then sized using a MegaBACE 1000 DNA sequencer (Amersham) and analyzed using the Genetic Profiler (version 2.2) and Fragment Profiler (version 1.2) programs (Amersham).

We used the program ADMIX.PAS (Long, 1991) to estimate the proportion of European, African and Amerindian biogeographical ancestry of each group (MSI+ and MSI-). We used the European, African and Amerindian individuals of the HGPD-CEPH Human Genome Diversity Cell Line Panel (Boland et al., 1998; Cann et al., 2002) as parental populations.

Statistical analysis

Hardy-Weinberg equilibrium was tested by the exact method of Guo and Thompson (1992), with 10,000 Markov steps. Data in a 2 x 2 format were analyzed using the Fisher exact test available in the Epi-Info software, version 6.0. Data on 2 x N tables were analyzed using the CLUMP software (Sham and Curtis, 1995), which was especially designed for use in genetic case-control association studies. In all tests, statistical significance was assumed at $P < 0.05$.

RESULTS

We genotyped the MTHFR C677T polymorphism in each of 106 dissected primary CRCs. In 32 patients for whom we had both cancer tissue and adjacent normal tissue, the typing results were identical in the two samples. We also typed 150 healthy controls from the southeast region of Brazil (Table 1). These two samples showed no significant departures from Hardy-Weinberg equilibrium, and there were no significant differences in the three genotype classes between cancer patients and healthy controls (Table 1).

To decrease the degrees of freedom and increase the power of the subsequent statistical tests, we pooled the 677CC and 677CT individuals, who had ample MTHFR activity, and contrasted them with the 677TT group. The clinicopathological information (patient sex and age, tumor location, histological features, Duke's stage (Williams and Beart, 1992), and recurrence) of 91 patients and the data for the 677CC + CT and the 677TT groups are shown in Table 2. No significant associations emerged. We also found no significant association between MTHFR polymorphism and promoter hypermethylation of the five tumor-associated genes

Table 1. Genotype frequencies of MTHFR C677T polymorphism in patients with colorectal cancer and in controls.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	P
Controls	137 (91)	13 (9)	-	-	-
Cases	91 (86)	15 (14)	1.74	0.47-4.10	0.17

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

Table 2. The MTHFR C677T polymorphism and clinicopathological features of patients with colorectal cancer.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	P
Men (N = 41)	36 (88)	5 (12)	-	-	-
Women (N = 50)	43 (86)	7 (14)	1.17	0.30-4.72	0.80
Age >70 (N = 36)	29 (81)	7 (19)	-	-	-
Age < 70 (N = 55)	50 (91)	5 (9)	2.41	0.61-9.82	0.20
Duke A (N = 15)	13 (87)	2 (13)	1.00	-	-
Duke B (N = 38)	32 (84)	6 (16)	1.22	0.18-10.10	0.99
Duke C (N = 37)	32 (86)	5 (14)	1.02	0.14-8.74	0.99

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

For Duke's stages (A, B, C), see Williams and Beart, 1992.

(*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*) in the 106 CRC samples (Table 3). Among the 106 tumors, 14 (13.3%) exhibited a high degree of MSI (MSI+). Fifty percent of the patients with MSI+ tumors (7/14) were TT genotype, in contrast with only 9% of the MSI- group (Table 4). This difference was very highly significant ($P = 0.00057$), indicating a strong association between MSI+ tumors and the 677TT genotype (odds ratio: 10.4; 95% confidence limits: 2.5-45.4).

Table 3. The MTHFR C677T polymorphisms and aberrant DNA methylation of five tumor-associated genes (*DAPK*, *MGMT*, *hMLH1*, *p16^{INK4a}*, and *p14^{ARF}*).

	CC + CT	TT	OR	95% CI	P
Not methylated	41	8	1	-	-
<i>hMLH1</i> methylated	15	4	1.37	0.29-6.12	0.72
<i>DAPK</i> methylated	20	1	0.26	0.01-2.30	0.26
<i>p16^{INK4a}</i> methylated	14	3	1.10	0.20-5.57	0.99
<i>p14^{ARF}</i> methylated	10	4	2.05	0.41-9.87	0.43
<i>MGMT</i> methylated	25	5	1.02	0.26-4.00	0.99
>3 loci methylated (10)	7	3	2.20	0.36-12.84	0.37
>2 loci methylated (26)	21	5	1.22	0.30-4.85	0.75
>1 locus methylated (57)	50	7	0.72	0.72-2.42	0.55

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

Table 4. Association between the MTHFR C677T polymorphism and microsatellite instability in colorectal cancer.

	CC + CT (%)	TT (%)	OR	95% CI	Pp
MSI- (91)	83 (91)	8 (9)	-	-	-
MSI+ (14)	7 (50)	7 (50)	10.4	2.5 - 45.4	0.00057

OR = odds ratio; 95% CI = 95% confidence interval for the odds ratio.

MSI- = no microsatellite instability; MSI+ = microsatellite instability.

Brazilians form a very heterogeneous population, which is the result of five centuries of interethnic crosses between peoples from three continents: the European colonizers, mainly represented by the Portuguese, African slaves, and the autochthonous Amerindians. These three groups have admixed to a point in which there is very little correlation between skin color and ancestry in Brazil (Parra et al., 2003). Since both the frequency of the 677T allele (Botto and Yang, 2000) and the incidence of MSI in CRC (Ashktorab et al., 2003) seem to differ between Africans and Europeans, we had to rule out the possibility that the significant association between MSI+ tumors and the 677TT genotype was due to ethnic stratification in our sample. We genotyped all cancer samples for 40 polymorphic indel loci, which form a powerful ancestry informative test battery (Bastos-Rodrigues et al., 2006). For the MSI+ group, the proportions of Europeans, Africans and Amerindians were 0.851 ± 0.046 (mean $\pm$ SE), 0.0935 ± 0.029 and 0.055 ± 0.032 , respectively, while for the MSI- group, the results were 0.868 ± 0.092 , 0.115 ± 0.057 and 0.017 ± 0.063 , respectively. The differences in the proportions of genomic ancestry between the two groups were not significant.

DISCUSSION

We did not observe an association between the MTHFR C677T genotype and CRC. Other studies also found no such correlation (Keku et al., 2002). We had no information about the folate status of our patients, though there is evidence that the association of MTHFR C677T and CRC is only evident when folate intake is adequate (Bailey, 2003; Sharp and Little, 2004). We also did not find any correlation of the MTHFR genotype with sex, age, tumor location, histological features, Duke's stage, recurrence, or promoter methylation of five tumor-associated genes (*hMLH1*, *DAPK*, *p16^{INK4a}*, *p14^{ARF}*, and *MGMT*).

However, we did find a very highly significant positive association between the 677TT genotype and MSI (Table 4). Such an association had been seen in some previous studies (Shannon et al., 2002), but not in others (Toffoli et al., 2003; Eaton et al., 2005). We tested for two possibilities that could explain the correlation that we observed. The first, ethnic stratification, was ruled out by genomic ancestry analysis. The second was the methylation status of the promoter region of the mismatch repair gene *hMLH1*. In fact, hypermethylation of *hMLH1* is the single most common recognizable form of MSI in sporadic colorectal tumors (Kane et al., 1997). However, as we (Anacleto, 2005b) and others (Yamashita et al., 2003) previously found, MSI is not always associated with hypermethylation of *hMLH1*. Indeed, when we analyzed the proportion of *hMLH1* hypermethylation among MSI tumors, there was no correlation with the 677TT genotype.

In conclusion, we found a strong correlation between the MTHFR C677TT genotype and MSI in CRC. This strong association appears independent of the biogeographical ancestry of the patients or of the methylation status of *hMLH1*. Although the mechanism responsible for the link between the C677T polymorphism and MSI was not apparent, this finding may provide a clue for a better understanding of the pathogenesis of MSI in human CRC.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by grants from Conselho de Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Brasil (CNPq). We thank Neuza Antunes Rodrigues, Miriam Rodrigues Costa and Kátia Barroso Gonçalves for providing expert technical support.

REFERENCES

- Aaltonen LA, Peltomäki P, Leach FS, Sistonen P, et al. (1993). Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 260: 812-816.
- Anacleto C, Rossi B, Lopes A, Soares FA, et al. (2005a). Development and application of a multiplex PCR procedure for the detection of DNA methylation in colorectal cancer. *Oncol. Rep.* 13: 325-328.
- Anacleto C, Leopoldino AM, Rossi B, Soares FA, et al. (2005b). Colorectal cancer "methylator phenotype": fact or artifact? *Neoplasia* 7: 331-335.
- Ashktorab H, Smoot DT, Carethers JM, Rahmani M, et al. (2003). High incidence of microsatellite instability in colorectal cancer from African Americans. *Clin. Cancer Res.* 9: 1112-1117.
- Bailey LB (2003). Folate, methyl-related nutrients, alcohol, and the MTHFR 677C→T polymorphism affect cancer risk: intake recommendations. *J. Nutr.* 133: 3748S-3753S.
- Bastos-Rodrigues L, Pimenta JR and Pena SDJ (2006). The genetic structure of human populations studied through short insertion-deletion polymorphisms. *Ann. Hum. Genet.* 70: 310-317.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, et al. (1998). 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.* 58: 5248-5257.
- Botto LD and Yang Q (2000). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase gene variants and congenital anomalies: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 151: 862-877.
- Cann HM, de Toma C, Cazes L, Legrand MF, et al. (2002). A human genome diversity cell line panel. *Science* 296: 261-262.
- Eaton AM, Sandler R, Carethers JM, Millikan RC, et al. (2005). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase 677 and 1298 polymorphisms, folate intake, and microsatellite instability in colon cancer. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 14: 2023-2029.
- Esteller M (2005). Aberrant DNA methylation as a cancer-inducing mechanism. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45: 629-656.
- Frosst P, Blom HJ, Milos R, Goyette P, et al. (1995). A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat. Genet.* 10: 111-113.
- Guo SW and Thompson EA (1992). Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportions for multiple alleles. *Biometrics* 48: 361-372.
- Herman JG and Baylin SB (2003). Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* 349: 2042-2054.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, et al. (1993). Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363: 558-561.
- Jemal A, Tiwari RC, Murray T, Ghafoor A, et al. (2004). Cancer statistics, 2004. *CA Cancer J. Clin.* 54: 8-29.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, et al. (1997). Methylation of the *hMLH1* promoter correlates with lack of expression of *hMLH1* in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res.* 57: 808-811.
- Keku T, Millikan R, Worley K, Winkel S, et al. (2002). 5,10-Methylenetetrahydrofolate reductase codon 677 and 1298 polymorphisms and colon cancer in African Americans and whites. *Cancer Epidemiol.*

- Biomarkers Prev.* 11: 1611-1621.
- Kono S and Chen K (2005). Genetic polymorphisms of methylenetetrahydrofolate reductase and colorectal cancer and adenoma. *Cancer Sci.* 96: 535-542.
- Long JC (1991). The genetic structure of admixed populations. *Genetics* 127: 417-428.
- Lynch HT and de la Chapelle A (2003). Hereditary colorectal cancer. *N. Engl. J. Med.* 348: 919-932.
- Parra FC, Amado RC, Lambertucci JR, Rocha J, et al. (2003). Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 177-182.
- Rajagopalan H, Nowak MA, Vogelstein B and Lengauer C (2003). The significance of unstable chromosomes in colorectal cancer. *Nat. Rev. Cancer* 3: 695-701.
- Rosenberg N, Murata M, Ikeda Y, Opare-Sem O, et al. (2002). The frequent 5,10-methylenetetrahydrofolate reductase C677T polymorphism is associated with a common haplotype in whites, Japanese, and Africans. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 758-762.
- Sham PC and Curtis D (1995). Monte Carlo tests for associations between disease and alleles at highly polymorphic loci. *Ann. Hum. Genet.* 59: 97-105.
- Shannon B, Gnanasampathan S, Beilby J and Iacopetta B (2002). A polymorphism in the methylenetetrahydrofolate reductase gene predisposes to colorectal cancers with microsatellite instability. *Gut* 50: 520-524.
- Sharp L and Little J (2004). Polymorphisms in genes involved in folate metabolism and colorectal neoplasia: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 159: 423-443.
- Thibodeau SN, Bren G and Schaid D (1993). Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260: 816-819.
- Toffoli G, Gafa R, Russo A, Lanza G, et al. (2003). Methylenetetrahydrofolate reductase 677 C→T polymorphism and risk of proximal colon cancer in north Italy. *Clin. Cancer Res.* 9: 743-748.
- Williams ST and Beart Jr RW (1992). Staging of colorectal cancer. *Semin. Surg. Oncol.* 8: 89-93.
- Yamashita K, Dai T, Dai Y, Yamamoto F, et al. (2003). Genetics supersedes epigenetics in colon cancer phenotype. *Cancer Cell* 4: 121-131.

ANEXO 11

Germ Line Mutations of Mismatch Repair Genes in Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Patients with Small Bowel Cancer: International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Collaborative Study

Jae-Gahb Park,^{1,2} Duck-Woo Kim,^{1,2} Chang Won Hong,^{1,2} Byung-Ho Nam,³ Young-Kyoung Shin,¹ Sung-Hye Hong,¹ Il-Jin Kim,¹ Seok-Byung Lim,^{1,2} Melyssa Aronson,⁴ Marie Luise Bisgaard,⁵ Gregor J. Brown,⁶ John Burn,⁸ Elizabeth Chow,⁶ Peggy Conrad,¹⁰ Fiona Douglas,⁹ Malcolm Dunlop,¹¹ James Ford,¹² Marc S. Greenblatt,¹² Jarvinen Heikki,¹⁴ Karl Heinimann,¹⁵ Elly L. Lynch,⁷ Finlay Macrae,⁶ Wendy C. McKinnon,¹³ Gabriela Möeslein,¹⁶ Benedito Mauro Rossi,¹⁷ Paul Rozen,¹⁸ Lyn Schofield,¹⁹ Carlos Vaccaro,²⁰ Hans Vasen,²¹ Mary Velthuisen,²¹ Alessandra Viel,²³ and Juul Wijnen²²

Abstract Purpose: The aim of study was to determine the clinical characteristics and mutational profiles of the mismatch repair genes in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) patients with small bowel cancer (SBC).

Experimental Design: A questionnaire was mailed to 55 members of the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours, requesting information regarding patients with HNPCC-associated SBC and germ line mismatch repair gene mutations.

Results: The study population consisted of 85 HNPCC patients with identified mismatch repair gene mutations and SBCs. SBC was the first HNPCC-associated malignancy in 14 of 41 (34.1%) patients for whom a personal history of HNPCC-associated cancers was available. The study population harbored 69 different germ line mismatch repair gene mutations, including 31 mutations in *MLH1*, 34 in *MSH2*, 3 in *MSH6*, and 1 in *PMS2*. We compared the distribution of the mismatch repair mutations in our study population with that in a control group, including all pathogenic mismatch repair mutations of the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours database (excluding those in our study population). In patients with *MSH2* mutations, patients with HNPCC-associated SBCs had fewer mutations in the MutL homologue interaction domain (2.9% versus 19.9%, $P = 0.019$) but an increased frequency of mutations in codons 626 to 733, a domain that has not previously been associated with a known function, versus the control group (26.5% versus 2.8%, $P < 0.001$).

Conclusions: In HNPCC patients, SBC can be the first and only cancer and may develop as soon as the early teens. The distribution of *MSH2* mutations found in patients with HNPCC-associated SBCs significantly differed from that found in the control group ($P < 0.001$).

Authors' Affiliations: ¹Korean Hereditary Tumor Registry, Laboratory of Cell Biology, Cancer Research Institute and Cancer Research Center, Seoul National University College of Medicine; ²Center for Colorectal Cancer and ³Cancer Biostatistics Branch, Research Institute and Hospital, National Cancer Center, Goyang, Korea; ⁴Familial Gastrointestinal Cancer Registry, Mt. Sinai Hospital, Ontario, Canada; ⁵Medical Genetic Clinic, Copenhagen University, Copenhagen, Denmark; ⁶Colorectal Medicine and Genetics and ⁷Familial Cancer Centre, Royal Melbourne Hospital, Parkville, Australia; ⁸Institute of Human Genetics, Newcastle University; ⁹Northern Region Genetics Service, Centre for Life, Newcastle-upon-Tyne, United Kingdom; ¹⁰University of California San Francisco Colorectal Cancer Prevention Program, University of California San Francisco, San Francisco, California; ¹¹Medical Research Council Human Genetics Unit, Western General Hospital, Edinburgh, United Kingdom; ¹²Cancer Genetics Clinic, Division of Oncology, Stanford University School of Medicine, Stanford, California; ¹³Familial Cancer Program, University of Vermont College of Medicine, Burlington, Vermont; ¹⁴Department of Surgery, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland; ¹⁵Research Group Human Genetics, Division of Medical Genetics, University of Basel, Basel, Switzerland; ¹⁶Department of Surgery, St. Josefs-Hospital Bochum-Linden, Bochum-Linden, Germany; ¹⁷Pelvic

Surgery Department, Hospital do Cancer A.C. Camargo, Sao Paulo, Brazil;

¹⁸Department of Gastroenterology, Tel Aviv Medical Center, Tel Aviv, Israel;

¹⁹Western Australian Familial Cancer Registry, Genetic Services of Western

Australia, Subiaco, Australia; ²⁰Program of Hereditary Cancer, Hospital Italiano de

Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina; ²¹Netherlands Foundation for the

Detection of Hereditary Tumours; ²²Center for Human and Clinical Genetics,

Leiden University Medical Center, Leiden, the Netherlands; and ²³Oncologia

Sperimentale 1, Centro Riferimento Oncologico, Aviano, Italy

Received 11/22/05; revised 3/15/06; accepted 3/28/06.

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Requests for reprints: Jae-Gahb Park, Korean Hereditary Tumor Registry, Laboratory of Cell Biology, Cancer Research Institute and Cancer Research Center, Seoul National University College of Medicine, 28 Yongon-Dong, Chongno-Gu, Seoul 110-744, Korea. Phone: 82-2-2072-3380; Fax: 82-2-742-4727; E-mail: jgpark@plaza.snu.ac.kr.

©2006 American Association for Cancer Research.

doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2452

Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC), the most common form of hereditary colorectal cancer, is inherited as an autosomal dominant trait with incomplete penetrance. HNPCC is associated with germ line mutations in the mismatch repair genes, which include *MLH1* (MIM #120436), *MSH2* (MIM #120435), *PMS2* (MIM #600259), and *MSH6* (MIM #600678; refs. 1, 2). About 90% of the identified germline mutations in the mismatch repair genes are found in two genes, *MLH1* and *MSH2* (2).

HNPCC accounts for 2% to 5 % of all colorectal cancers and is characterized by early age of onset, predominantly right-sided colorectal cancer, frequent development of synchronous and metachronous colorectal cancer, and extracolonic malignancies (3–7), including endometrial, small bowel, ovary, ureter, and renal pelvic carcinomas. Individuals affected with HNPCC are also at an increased risk for developing hepatobiliary, brain, and skin tumors (8, 9).

In the general population, small bowel cancer (SBC) is relatively rare, accounting for <2% of all gastrointestinal cancers (10). However, in HNPCC patients, the lifetime risk for SBC reportedly ranges from 1% to 4%, which is >100 times the risk in the general population (8). In the Korean Hereditary Tumor Registry, SBCs were found in six patients from three families among 116 families with HNPCC or suspected HNPCC registered. Three different germ line mismatch repair gene mutations were identified in these six patients, all located on the PMS2/MLH3/PMS1 interaction domain of the *MLH1* gene.

In an effort to gain insight into the associations among HNPCC, SBC, and germ line mismatch repair gene mutations, we collaborated with the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours to conduct a retrospective study of the clinical characteristics of SBC in HNPCC patients and their correlations with various mismatch repair genotypes.

Materials and Methods

Patients. A questionnaire was mailed to 55 members of the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours from 21 countries, requesting information regarding HNPCC patients in their registries who were diagnosed as having SBC. The following clinical data were requested: age at diagnosis of SBC and other malignant disease, gender, personal history of HNPCC-associated malignant disease, family history of SBC, and various characteristics of SBC, such as histologic type, histologic grade, and tumor location. Mutational information was also requested, including identification of the mutated mismatch repair gene, the location of mutation, the nucleotide alteration, and its predicted effect on protein synthesis.

Seventeen members from 13 countries answered the questionnaire. We were able to collect information on 87 patients with SBCs from 78 HNPCC families (68 HNPCC families and 10 suspected HNPCC families). Patients were included in this study only when a pathogenic germline mutation in the mismatch repair gene was identified. Two patients were excluded from the present study, one from the United Kingdom with mutations in both *APC* and *MSH2* and one from the Dutch HNPCC Registry in whom ileal adenocarcinoma was diagnosed at the age of 61 but for whom mismatch repair mutation data were not available. Thus, the study population consisted of 85 patients with identified germ line mismatch repair mutations and a total of 90 SBCs.

Statistical analysis. Sex (male versus female), location of SBC (duodenum versus distal to duodenum), affected mismatch repair gene (*MLH1* versus *MSH2*), and the first HNPCC-associated cancer (SBC versus non-SBC) were considered to be binary variables for determining

the characteristics of our SBC patients. The age at diagnosis of SBC was analyzed as a continuous variable. The various variables were analyzed using the χ^2 and Fisher's exact tests. All statistical tests were two sided and done with SAS programs (version 8.01, SAS Institute, Inc., Cary, NC). $P \leq 0.05$ was considered statistically significant. For analysis of mismatch repair gene mutation distribution patterns, all mismatch repair gene mutations (excluding those found in our experimental group) registered in the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours database (<http://www.insight-group.org/>) were used as the control group.

Results

Clinical characteristics. Eighty-five individuals from 78 HNPCC families were identified as having germ line mismatch repair gene mutations and a total of 90 SBCs. Of these patients, 51 were male (60.0%). The mean age at diagnosis of SBC was 48 years (range, 11–81 years). Nine patients (10.6%) developed SBC before the age of 30; the patient with the youngest age of diagnosis was a male from Canada, who was diagnosed with HNPCC-associated SBC at the age of 11. Sixty of the 85 patients (70.6%) met the Amsterdam criteria; 11 patients did not meet the Amsterdam criteria, and information on the Amsterdam criteria status was unavailable in the remaining 14 patients.

Four patients had metachronous SBCs. Three patients each had one metachronous SBC that developed at 7, 9, 13 years, respectively, after the index SBC. One patient from Australia had two metachronous SBCs that developed in the jejunum and ileum 21 years after the index SBC in the duodenum. Histologically, the SBC types were as follows: 74 adenocarcinomas (82.2%), 2 carcinoid tumors (2.2%), and 14 not specified (15.6%). The localization of the reported SBC was unknown in 17 patients. The remaining 68 patients had 72 localized SBCs; the duodenum and jejunum were equally affected (31 of 72, 43.1% in each case), and ileal SBCs were seen less frequently (10 of 72, 13.9%).

Personal history regarding other malignant disease was available for 41 patients, in which 51 colorectal cancers developed in 27 cases. SBC was the first HNPCC-associated malignancy in 14 of the 41 patients (34.1%), and 9 of the 41 patients (22.0%) had SBC as their only HNPCC-associated cancer at the time of data collection. In the 14 patients wherein SBC was the first identified HNPCC-associated cancer, colorectal cancers developed in only 3 (21.4%). The other HNPCC-associated malignancies identified in the 41 patients included 5 endometrial cancers, 4 renal pelvis/ureter cancers, 3 ovarian cancers, and 1 pancreatic cancer.

Mismatch repair mutations. Sixty-nine different germline mismatch repair gene mutations were identified in the study population; 31 mutations were identified in the *MLH1* gene (44.9%), 34 in the *MSH2* gene (49.3%), 3 in the *MSH6* gene (4.3%), and 1 in the *PMS2* gene (1.4%). Thirty-one different *MLH1* mutations were identified in 42 patients, including 25 truncation mutations (80.6%) and 6 missense mutations (19.4%). Thirty-four different *MSH2* mutations were identified in 38 patients, including 28 truncation mutations (82.4%) and 6 missense mutations (17.6%). Two truncation mutations and one missense mutation were identified in *MSH6*, and one truncation mutation of *PMS2* was identified in two patients from the same family.

We determined the frequency of mutations in each functional domain of the *MLH1* gene, including the ATPase domain,

the MutS homologue interaction domain, and the PMS2/MLH3/PMS1 interaction domain. Seven of 31 mutations were found in the ATPase domain, 9 in the MutS homologue interaction domain, and 15 in the PMS2/MLH3/PMS1 interaction domain. Similarly, we analyzed the distribution of *MSH2* mutations in the DNA-binding domain, the MSH3/MSH6 interaction domain, the MutL homologue interaction domain, and a region that had no known function (codons 626-733; ref. 11). Fourteen of 34 mutations were found in the DNA binding domain, 10 in the MSH3/MSH6 interaction domain, 1 in the MutL homologue interaction domain, and 9 in a region that had no known function (codon 626-733). We then compared the distribution of *MLH1* and *MSH2* mutations in our study population with those in a control group derived from the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours database. As shown in Table 1, the distribution of *MLH1* mutations did not differ between the experimental and control groups ($P = 0.44$), but the distribution of *MSH2* mutations found in HNPCC patients with SBCs was significantly different from that in the control group ($P < 0.001$). Patients with SBCs had less frequent mutations in the MutL homologue interaction domain (2.9% versus 19.9%, $P = 0.019$, Fisher's exact test), but more frequent mutations in codons 626 to 733 (26.5% versus 2.8%, $P < 0.001$, Fisher's exact test). There were no significant differences in the mutational frequencies of the DNA-binding and MSH3/MSH6 interaction domains of *MSH2*. In Table 1, we determined the frequency of mutations in each functional domain of the *MLH1* and *MSH2* genes and compared this distribution with those in a control group derived from the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours database. Thus, the data are presented in terms of the number of different germline mutations not families or individual cases.

Forty-four SBCs developed in 42 patients with germline mutations of the *MLH1* gene: 16 in the duodenum (36.4%), 11 in the jejunum (25.0%), 5 in the ileum (11.4%), and 12 in unspecified locations (27.3%). Forty-one SBCs developed in 38 patients with *MSH2* mutations: 13 in the duodenum (31.7%), 18 in the jejunum (43.9%), 4 in the ileum (9.8%), and 6 in unspecified locations (14.6%). There were no significant

differences in the locations of SBCs between patients with mutations in *MLH1* and *MSH2* ($P = 0.208$, Fisher's exact test).

Discussion

SBC is relatively rare in the general population, with an incidence of reportedly <10 cases per one million people annually (12). However, patients with Crohn's disease and hereditary colorectal cancer syndromes, such as HNPCC, familial adenomatous polyposis, and Peutz-Jegher syndrome, have a 50- to 300-fold higher risk of developing SBC versus the general population (13–15). However, although it is accepted that HNPCC patients are at an increased risk for developing SBC, it has proven difficult for a single investigator or institution to collect a large number of HNPCC patients with SBCs for analysis. Thus, we conducted an international collaborative study.

To our knowledge, only two previous studies have focused on HNPCC-associated SBC. Rodriguez-Bigas et al. reported 49 SBCs from 42 HNPCC patients, based on a questionnaire mailed to members of the International Collaborative Group on HNPCC, which includes individuals from the United States, the Netherlands, Denmark, Finland, Australia, Italy, Portugal, Canada, and Israel (13). Recently, a study from the German HNPCC Consortium reported 32 SBCs from 31 unrelated HNPCC patients, detailing both the pathologic features and the clinical characteristics (16). Similar to the study by Rodriguez-Bigas et al., the present work was based on a questionnaire mailed to participating centers from 13 countries worldwide. Thus, it is possible that our findings may be biased by differences among the participating registries in terms of patient selection, terminologies, and policies regarding management for HNPCC patients and at-risk family members. However, our patient population is the largest group of HNPCC patients with SBCs reported to date, and all enrolled patients had identified germline mismatch repair gene mutations, allowing us to examine possible genotype-phenotype correlations.

HNPCC patients reportedly develop cancers at earlier ages than seen in sporadic cancer patients. The mean age at

Table 1. Distribution of the mismatch repair mutations in HNPCC patients with SBCs

A. <i>MLH1</i> gene (<i>P</i> = 0.44, χ^2 test)					
	ATPase domain (codon 31-151)	MutS homologue interaction domain (152-327)	PMS2/MLH3/PMS1 interaction domain (491-742)		Total
Present study*	7 (22.6%)	9 (29.0%)	15 (48.4%)		31 (100%)
Controls [†]	58 (28.2%)	73 (35.4%)	75 (36.4%)		206 (100%)
B. <i>MSH2</i> gene (<i>P</i> < 0.001, Fisher's exact test)					
	DNA binding domain (codon 1-346)	MSH3/MSH6 interaction domain (codon 378-625)	Region including Walker A (codon 626-733)	MutL homologue interaction domain (codon 734-895)	Total
Present study*	14 (41.2%)	10 (29.4%)	9 (26.5%)	1 (2.9%)	34 (100%)
Controls [†]	55 (39.0%)	54 (38.3%)	4 (2.8%)	28 (19.9%)	141 (100%)

*The data are presented in terms of the number of different germ line mutations and not families or individual cases.

†Controls were assembled from the database of the International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours (<http://www.insight-group.org/>).

diagnosis of SBC in our study population was 48 years, which is consistent with the age reported in two previous studies (13, 17), but is ~10 years older than the age of diagnosis reported for German patients (16). We found that SBCs occurred at similar ages at which diagnosis of colorectal cancer and endometrial cancers were made in our HNPCC patients, which is consistent with a previous report (18). Our data also indicated that some HNPCC-associated SBCs could occur at a very early age. Over 10% of our patients were diagnosed with SBCs before the age of 30, with two cases occurring as early as 11 and 17 years of age. These findings suggest that clinicians managing HNPCC patients and at-risk family members should be alert for unusually early manifestations of SBC. The patient from Italy in the study population, who was diagnosed with SBC at the age of 17 and underwent surgery for an infiltrating adenocarcinoma of the duodenum, had biallelic mutations of the mismatch repair gene. *PMS2* genetic testing identified the nonsense 1951C>T (Q643X) and the missense 161C>T (S46I) mutations, and these two mutations were located in two different alleles of the patient, with the nonsense mutation inherited from his mother and the missense mutation probably inherited from his father (19). Although it remains to be defined, correlation between biallelic mutations and very young cancer might be probable.

Studies have shown that both sporadic (20) and HNPCC-associated (13, 16) SBCs are more common in males than females, with the latter showing a reported 3:1 ratio of males to females. In the present study, 60% of our enrolled patients were male, yielding a 3:2 ratio of males to females that is relatively consistent with the previous findings. When we analyzed patients grouped with respect to *MLH1* and *MSH2* mutations, male patients predominated in both subgroups, and there was no significant difference in the gender ratio.

In terms of histology, an early study reported adenocarcinoma as the only HNPCC-associated colorectal cancers (17), but more recent studies showed that 4% to 6% of HNPCC-associated SBCs are carcinoid tumors (13, 16). Consistent with the latter reports, most of the SBCs in our study population were adenocarcinomas (82.2%), but 2 carcinoid tumors (2.2%) were also identified. With regard to localization of HNPCC-associated SBCs, the previous study in a German population reported that half of HNPCC-associated SBCs developed in the duodenum (16), whereas Rodriguez-Bigas et al. reported an almost uniform distribution of SBCs throughout the small bowel (13). In the present study, data on tumor location were available in 72 of 90 SBCs (80.0%). Most of the tumors with identified locations occurred in the proximal small bowel, with ileal cancers occurring at a lower frequency. The duodenum and jejunum was equally affected, and endoscopic surveillance could have detected 43% of the HNPCC-associated SBCs identified in our patients. There were no significant differences in tumor location between patients with mutations in *MLH1* versus *MSH2*, and in some families, SBCs developed in different locations among family members

having identical germline mismatch repair mutations. Thus, it does not seem as though the genotype can be used to predict tumor location.

Our data indicated that SBC could be the first and only cancer in HNPCC patients. Furthermore, although the lifetime cumulative risk of colorectal cancer is about 80% in HNPCC patients, colorectal cancer developed less frequently (3 of 14, 20.4%) in patients in whom SBC had occurred as the first cancer. This result might be influenced by several factors, including the sample size and the death of patients from other cancers before development of colorectal cancer. However, the presence of patients having only SBC without colorectal cancer in our study population suggests that a family history should be obtained from all patients newly diagnosed as having SBCs.

Although our study was not designed to compare the incidence of SBC among HNPCC patients with mutations in the different mismatch repair genes, our study population contained similar numbers of individuals with mutations in *MLH1* and *MSH2* (31 and 34, respectively). Vasen et al. (21) reported that the lifetime risk of cancer at any site was significantly higher for *MSH2* mutation carriers versus *MLH1* mutation carriers. The same report indicated that *MSH2* mutation carriers had higher risks for developing cancer of the stomach, ovary, and brain, but not SBC. Consistent with our findings, Vasen et al. reported that of the 16 SBC patients in their study, 9 had mutations in *MLH1* and 7 had mutations in *MSH2* (21). Peltomaki et al. reported that extracolonic cancers were more common in *MSH2* mutation carriers, but their study included only two ileal cancers, which developed in two patients with mutations in *MLH1* (22). Because of the relatively rarity of SBCs in HNPCC patients, it is difficult to accurately estimate the incidence of SBC in carriers of specific mismatch repair gene mutations.

In conclusion, we herein examined the mutational spectrum in HNPCC patients with SBCs, examined the frequency of mutations in each functional domain of the *MLH1* and *MSH2* genes, and showed for the first time that the distribution of *MSH2* mutations in HNPCC patients with SBC significantly differed from that of a control group. Patients with SBCs had less frequent mutations in the MutL homologue interaction domain but more frequent mutations in a region without known function (codons 626-733). This result suggests that mutational spectrums might differ among patients having different sets of cancers.

Conclusions

SBC can be the first and only cancer in HNPCC patients and may develop as soon as the early teens. The duodenum and jejunum are commonly and equally affected, with ileal SBC found less frequently. Patients with SBCs have fewer mutations in the MutL homologue interaction domain but more frequent mutations in codons 626 to 733, a domain of previously unknown function.

References

1. Peltomaki P, Vasen HF. The International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study. *Gastroenterology* 1997;113:1146–58.
2. Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, et al. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169–74.
3. Fitzgibbons R, Lynch HT, Stanislav G, et al. Recognition and treatment of patients with hereditary nonpolyposis colon cancer (Lynch syndromes I and II). *Ann Surg* 1987;206:289–95.
4. D'Emilia JC, Rodriguez-Bigas MA, Petrelli NJ. The clinical and genetic manifestations of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Am J Surg* 1995;169:368–72.
5. Marra G, Boland CR. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC): the syndrome, the genes, and

- historical perspective. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:1114–25.
6. Bertario L, Aste H, Arrigoni A, et al. Clinical aspects and management of hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC). *Tumori* 1996;82:117–21.
 7. Lynch HT, Smyrk TC, Lynch J. An update of HNPCC (Lynch syndrome). *Cancer Genet Cytogenet* 1997;3:84–99.
 8. Aarnio M, Sankila R, Pukkala E, et al. Cancer risk in mutation carriers of DNA mismatch repair genes. *Int J Cancer* 1999;81:214–8.
 9. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677–85.
 10. Ashley SW, Wells SA. Tumors of the small intestine. *Semin Oncol* 1988;15:116–28.
 11. Sandrine J, Francoise P. DNA mismatch repair defects: role in colorectal carcinogenesis. *Biochimie* 2002;87:27–47.
 12. Chow JS, Chen CC, Ahsan H, Neugut AI. A population-based study of the incidence of malignant small bowel tumors: SEER, 1973–90. *Int J Epidemiol* 1996;78:653–6.
 13. Rodriguez-Bigas MA, Vasen HFA, Lynch HT, et al. Characteristics of small bowel carcinoma in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;83:240–4.
 14. Mason GR. Tumors of the duodenum and small intestine. In: Sabiston DG, editor. *Textbook of surgery*. 15th ed. Philadelphia: W.B. Saunders Co.; 1997. p. 882–7.
 15. Offerhaus GJ, Giardiello FM, Krush AJ, et al. The risk of upper gastrointestinal cancer in familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* 1992;102:1980–2.
 16. Schulmann K, Brasch FE, Kunstmann E, et al. HNPCC-associated small bowel cancer: clinical and molecular characteristics. *Gastroenterology* 2005;128:590–9.
 17. Lynch HT, Smyrk TC, Lynch PM, et al. Adenocarcinoma of the small bowel in Lynch syndrome II. *Cancer* 1989;64:2178–83.
 18. Lynch HT, Lansps SJ, Smyrk TC, Boman BM, Watson P, Lynch J. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I & II): genetics, pathology, natural history, and cancer control, part I. *Cancer Genet Cytogenet* 1991;53:143–60.
 19. Agostini M, Tibiletti MG, Lucci-Cordisco E, et al. Two *PMS2* mutations in a Turcot syndrome family with small bowel cancers. *Am J Gastroenterol* 2005;100:1886–91.
 20. Frost DB, Mercado PD, Tyrell JS. Small bowel cancer: a 30-year review. *Ann Surg Oncol* 1994;1:290–5.
 21. Vasen HFA, Stormorken A, Menko FH, et al. *MSH2* mutation carriers are at higher risk of cancer than *MLH1* mutation carriers: a study of hereditary nonpolyposis colorectal families. *J Clin Oncol* 2001;19:4074–80.
 22. Peltomaki P, Gao X, Mecklin J-P. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. *Fam Cancer* 2001;1:9–15.

ANEXO 12

Two new *MLH1* germline mutations in Brazilian lynch syndrome families

M. V. Dominguez · E. P. Bastos · E. M. M. Santos ·
L. P. Oliveira · F. O. Ferreira · D. M. Carraro ·
B. M. Rossi

Accepted: 4 June 2008
© Springer-Verlag 2008

Colorectal cancer (CRC) is a major public health problem worldwide, with a current annual incidence approaching 950,000 cases. Around 3–5% of all CRC cases are recognized as hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC), or Lynch Syndrome (LS), which is an inherited syndrome predisposing to the early development of cancers of colon, rectum, endometrium, ovary, small bowel, stomach, and urinary tract, with an estimated penetrance of 80%. The clinical diagnosis is made by characteristic family history.

This autosomal dominantly inherited disorder is caused by germline mutations in genes coding proteins responsible for the repair of DNA replication errors, which are referred to as DNA mismatch repair (MMR) genes. At present, seven MMR genes are known (*MLH1*, *MSH2*, *MLH3*, *MSH3*, *MSH6*, *PMS1* and *PMS2*); however, the influence of a specific mutation on the pathogenesis of the disease shows great diversity.

According to InSIGHT (International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumors) database, approximately 50% and 40% of the HNPCC-causing mutations are found in the *MLH1* (MIM#120436) and *MSH2* (MIM#120435) genes, respectively. In total, 259 different pathogenic mutations have been identified in *MLH1*, along with 45 polymorphisms. The *MLH1* gene is a component of the mismatch repair pathway and is located at chromosome

3p21–23, and it has been shown to form heterodimer with *MLH3*, *PMS2* or *PMS1*. The *MLH1* protein has no known enzymatic activity and probably acts as a “molecular matchmaker” in that it recruits other DNA repair proteins to the mismatch repair complex.

In this study, our goal was to perform the genetic analysis of 20 patients who had been selected by Amsterdam and Bethesda Criteria, and to identify the novel genetic alterations in the *MLH1* gene.

Samples and DNA extraction. Blood sample was collected from one adult healthy control who did not present mutation in *MLH1* gene, and it was used as a reference for denaturing high performance liquid chromatography (DHPLC) experiment. We analyzed DNA from 20 samples from 15 families who met the stringent Amsterdam criteria, and five fulfilling the Bethesda criteria obtained at the Department of Pelvic Surgery of the Hospital A.C. Camargo after an informed consent. DNA was directly extracted from 3 ml of whole blood using Puregene Genomic DNA Isolation Kit (Gentra Systems, USA) according to manufacturer's instructions.

PCR conditions. Primers were designed to amplify all exons and splice sites of *MLH1* and *MSH2* genes (GenBank accession number NM.000249 and NM.000251, respectively). Primers used in this study were divided in two fragments for exons upper of 250 bases in order to obtain the best performance in DHPLC analysis.

DHPLC. DNAs amplified as described above were submitted to a denaturing step by heating at 95°C for 5 min followed by a gradual re-annealing to enhance heteroduplex formation. Fifteen microliters of each re-annealed polymerase chain reaction (PCR) product was applied to an automated DHPLC apparatus equipped with DNasep column (wave-nucleic acid fragment analysis system-Transgenomic, Omaha, NE, USA).

M. V. Dominguez · E. P. Bastos · D. M. Carraro
Laboratory of Genomic and Molecular Biology,
Treatment and Investigation Center, Hospital A.C. Camargo,
São Paulo, Brazil

M. V. Dominguez · E. M. M. Santos · L. P. Oliveira ·
F. O. Ferreira · B. M. Rossi (✉)
Department of Pelvic Surgery, Hospital A.C. Camargo,
Rua Professor Antonio Prudente,
211-01509-900 São Paulo, Brazil
e-mail: bmrossi@hccancer.org.br

DNA sequencing. PCR products showing altered DHPLC profile were purified with the GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, SP, Brazil) and sequenced in both directions. Sequencing reactions were separated on ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, SP, Brazil).

Among the 20 probands from 20 Brazilian HNPCC kindreds, 460 PCR products of 14 exons of *MLH1* and nine exons for *MSH2* were screened by DHPLC. These exons included in this study are frequently most affected in HNPCC kindreds. Two PCR products found with variation elution peaks by DHPLC were identified to have mutations. One was in intronic region at exon 15 of *MLH1* at nt. 1707 A→G in SL-1D proband. The SL-1D proband was a 44-year-old woman from a family that fulfilled the Amsterdam Criteria. She had a right colon cancer (T2N0M0) diagnosed in 2003, and she was submitted to a partial colectomy and to adjuvant chemotherapy with 5-fluorouracil and folinic acid for 12 months in another institution. In 2005, she was diagnosed with gastric cancer, submitted to a partial gastrectomy and liver metastasis resection (T2N0M1). She had a low-grade adenoma resected in 2008. In this kindred, each PCR product from altered DHPLC profile for *MLH1* and *MSH2* genes was tested by direct DNA sequencing. The transversion was found in intron 15 at nt. 1707 A→G of *MLH1* gene.

The other mutation was found in SL-6D proband by DHPLC and confirmed by sequencing analysis, a single substitution at nt. 1632 G→A of intron 13 of *MLH1* was found. The SL-6D proband was a 47-year-old man and his family who fulfilled the Amsterdam Criteria. Screening colonoscopy showed two colon adenocarcinomas. In 2005, he was submitted to a proctocolectomy with J pouch and temporary ileostomy. The pathological examination showed three tumors: one in the cecum, another in the right colon, and a third one in the left colon. All tumors were well-differentiated adenocarcinoma with mucinous component, without lymph node involvement. In 2007, a 2-cm low-grade adenoma was diagnosed, located at 0.5 cm from the anal sphincter. He is in follow-up without evidence of disease.

Colorectal cancer is one of the most common cancers, and its clinical selection criteria for LS were first established in Amsterdam in 1991 by the International Collaborative Group on HNPCC, and modified in 1999. Identification of germline mutations of either *MLH1* or *MSH2* could be possible in 50–70% of families meeting the Amsterdam criteria for LS. Families not complying with these criteria show a much lower frequency of the MMR gene mutation identification. Thus, *MLH1* and *MSH2* gene testing is most often used in early diagnosis of at-risk family members with HNPCC. To identify a population-specific panel of mutations, it is crucial to describe them in all ethnic groups. In Brazil, in contrast to Europe, it is very difficult to determine the exact origin of individual families. There is heterogeneous racial miscegenation due to Portuguese, Italian and Japanese migration, as well as from Africa, and native Brazilian Indians, which is similar to that observed in Colombia, but in contrast to LS families from Uruguay. Rossi et al [1] reported for the first time seven novel mutations in *MLH1* and *MSH2* in 25 unrelated LS Brazilian families.

In this study, two novel nonsense mutations were found among 20 Brazilian HNPCC kindreds. The mutations found were compared to mutations already described in the database of the International Collaborative Group on HNPCC (<http://www.insight-group.org>) and Human Gene Mutation Database (HGMD). To our knowledge, these two intronic mutations bordering exons 13 and 15 of *MLH1* represent novel alterations that, to date, have not been observed in other HNPCC kindreds. These mutations were not predicted to result in severely truncated protein products with impaired capacity in MMR.

References

1. Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ (2002) hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 9(6):555–561, July