

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARLOS EDUARDO FERREIRA PITROSKI**

**ANÁLISE DO GENE *MUTYH* EM INDIVÍDUOS EM RISCO PARA SÍNDROME DA  
POLIPOSE ASSOCIADA AO GENE *MUTYH*.**

**ORIENTADOR: PROFA. DRA. PATRÍCIA ASHTON-PROLLA**

**PORTO ALEGRE, BRASIL**

**2010**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARLOS EDUARDO FERREIRA PITROSKI**

**ANÁLISE DO GENE *MUTYH* EM INDIVÍDUOS EM RISCO PARA SÍNDROME DA  
POLIPOSE ASSOCIA AO GENE *MUTYH*.**

**Apresentação desta dissertação é exigência do Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Mestre.**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Patrícia Ashton Prolla**

**PORTO ALEGRE, BRASIL**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Pitroski, Carlos Eduardo

Caracterização Clínica e Histomolecular de Tumores de Pacientes em Risco para Síndrome de Lynch/ Carlos Eduardo Ferreira Pitroski; orient. Patrícia Ashton-Prolla – Porto Alegre, 2010.

f.: il.

Dissertação (Mestrado), apresentada à Faculdade de Medicina de Porto Alegre da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas.

Orientadora: Ashton-Prolla, Patricia

“Voglio vivere così col sole in fronte  
e felice canto beatamente  
voglio vivere e goder l’aria del monte  
e per questo incanto non costa niente.”

**Luciano Pavarotti**

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer aos meus pais, pelo amor incondicional, pelo exemplo de perseverança, por ter me ensinado os verdadeiros valores da vida e a importância da família em todos os momentos e, principalmente, quando se está distante de casa.

Ao meu irmão, Lucas pelo apoio, carinho e pelas piadas sem graça que por muitas vezes me fizeram sorrir nas mais inesperadas madrugadas.

Aos meus “pais” gaúchos nestes quase nove anos de Rio Grande do Sul, Ernani e Arlete.

A minha noiva Taísa, pela compreensão, apoio, carinho e por todos os momentos nestes dois últimos anos.

Aos meus amigos, que sempre me apoiaram em todos os momentos Ingrid Ewald, Liliane Todeschini, Jamile Abud, Patrícia Izetti, Júlia Protas, Juliana Giacomazzi, Larissa Bueno, Ernestina Aguiar, Gabriel Macedo, Diego Paskulin e Patrícia Koehler.

A grande amiga Liliana Cossio por todo apoio intelectual, técnico e principalmente pela amizade e paciência no período de redação da dissertação.

A minha eterna amiga Estela Busanello por todo o apoio e carinho desde os primeiros anos da faculdade.

A minha orientadora Profa. Dra. Patricia Ashton Prolla por toda a dedicação, orientação, incentivo, compreensão e apoio tanto âmbito profissional como no pessoal nestes dois últimos anos.

Aos professores do programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas por fazerem parte do meu crescimento profissional neste período.

E, finalmente, as demais pessoas que contribuíram e incentivaram de alguma forma a realização deste trabalho.

A todos, meu mais sincero obrigado.

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS .....	9
Lista de Figuras.....	10
RESUMO .....	11
REVISÃO TEÓRICA .....	16
1. EPIDEMIOLOGIA.....	16
2. FATORES DE RISCO.....	16
2.1 Dieta como fator de risco para CCR.....	17
2.1.1 Frutas e Vegetais .....	17
2.2 Álcool .....	18
2.3 Tabaco.....	18
2.4 Medidas Antropométricas e atividade física.....	19
2.5 Inflamação Crônica .....	19
2.6 Fatores Modificadores do risco de CCR .....	20
2.7 História Familiar.....	21
3. CARCINOGÊNESE COLORRETAL.....	21
3.1. Instabilidade Cromossômica .....	22
3.2 Instabilidade de Microssatélites .....	23
4. PATOLOGIA.....	24
4.1 Morfologia .....	24
4.2 Pólipos de intestino e sua relação com câncer colorretal. ....	25
4.2.1 Adenomas .....	25
4.2.1.1 Adenomas Tubulares.....	26
4.2.1.2 Adenomas Vilosos.....	26
4.2.1.3 Adenomas Túbulo-vilosos .....	27
4.3 Pólipos Hiperplásicos.....	27
4.4 Pólipos Serrilhados .....	28
4.5 Pólipos Hamartomatosos .....	28

5. SÍNDROME DA POLIPOSE JUVENIL.....	29
6. SÍNDROME DE PEUTZ–JEGHERS .....	30
7. POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF) .....	31
7.1. Aspectos Gerais .....	31
7.2 Aspectos Clínicos.....	32
7.2.1 Manifestações colônicas .....	32
7.2.2 Outras manifestações Gastrointestinais e Extracolônicas .....	33
8. SÍNDROME DE LYNCH .....	33
8.1 Aspectos Gerais da Síndrome.....	33
8.2. Descrição Clínica da Síndrome de Lynch.....	34
8.2.1. Espectro de Tumores .....	34
8.2.2.Câncer Colorretal (CCR) .....	35
8.3. Estimativas de Risco.....	35
8.4. Critérios Clínicos para diagnóstico da Síndrome de Lynch .....	35
8.5. Aspectos Moleculares .....	36
8.5.1. Sistema MMR de Reparo do DNA.....	36
8.5.2. Sistema MMR e Instabilidade Genômica.....	37
8.6. Diagnóstico Molecular.....	37
9. GENE <i>MUTYH</i> E SÍNDROME DA POLIPOSE ASSOCIADA AO GENE <i>MUTYH</i> .....	37
9.1 Família “N” .....	38
9.2 Sistema de Reparo por Excisão de Bases (BER).....	39
9.2.1 Enzimas MTH1 e OGG1 .....	41
9.2.1 Gene <i>MUTYH</i> – <i>hMYH</i> – <i>hMutY</i> .....	41
9.2.2.1 Mutações em <i>MUTYH</i> .....	43
9.3 Síndrome da Polipose Associada ao gene <i>MUTYH</i> (PAM) .....	45
9.3.1 Considerações gerais .....	45
9.3.2 Manifestações Colônicas .....	46
9.3.3 Correlação Genótipo/Fenótipo .....	46

9.3.3.1 Heterozigotos .....	46
9.3.4 Características Histológicas e Moleculares apresentadas na síndrome PAM .....	47
9.3.4.1 Instabilidade de Microssatélites (IMS) .....	48
9.3.5 Manifestações Extracolônicas.....	48
11. OBJETIVOS.....	52
13 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77
ANEXOS .....	79
Anexo 1 – Critérios Clínicos de Amsterdam .....	79
Anexo 2 – Critérios Clínicos de Bethesda .....	80
Anexo 3: TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido .....	81
Anexo 4. Gráficos de Discriminação Alélica.....	84
Anexo 5. Protocolos Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	85



## LISTA DE ABREVIATURAS

CCR	Câncer colorretal
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PAFA	Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada
HNPCC	Hereditary Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer - Câncer Colorretal Hereditário não polipomatoso
SL	Síndrome de Lynch
SL-Bet	Síndrome de Lynch Critério clínico de Bethesda
SL-Am	Síndrome de Lynch Critério clínico de Amsterdam
PAM	Polipose Associada ao gene MUTYH
IMS	Instabilidade de Microssatélites
BER	Base excision repair - Reparo por excisão de bases
MMR	Mismatch Repair – Reparo de Pareamento Incorreto
PCR	Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

## Lista de Figuras

- Fig. 1 Fig. 1 - Sequência Adenoma-Carcinoma, página 22.
- Fig. 2 Fig. 2 - "Família N", página 41.
- Fig. 3 Fig. 3 - Reparo por excisão de Bases, página 42.
- Fig. 4 *Espectro de Mutações de acordo com os domínios proteicos de MUTYH, página 44.*
- Fig. 5 Frequência das mutações de MUTYH relatadas em pacientes PAM com mutações, página 45.
- Fig. 6 Frequência alélica de mutações germinativas em portadores bialélicos e monoalélicos, Página 47.
- Fig. 7 Gráfico de discriminação alélica p.Y176C
- Fig. 8 Gráfico de Discriminação alélica p.G396D

## RESUMO

O câncer colorretal (CCR) é a terceira neoplasia maligna mais comum no mundo em ambos os sexos. Estima-se que 5 a 10% dos pacientes que desenvolvem CCR sejam portadores de mutação germinativa em genes de predisposição ao câncer. As síndromes de câncer colorretal hereditário podem ser divididas em: (a) associadas a polipose colônica (Polipose Adenomatosa Familiar – PAF, Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada – PAFA, e Polipose Associada a MUTYH – PAM), e (b): as não associadas com polipose colônica (de Lynch – SL). A SL é uma doença autossômica dominante que decorre de mutações nos genes do sistema MMR (*Mismatch Repair*) de reparo do DNA, a qual tem como característica o desenvolvimento precoce de câncer colorretal (CCR) e a ocorrência de poucos pólipos sincrônicos ou metacrônicos. Em contraste, a síndrome PAF é caracterizada pelo desenvolvimento de centenas a milhares de pólipos adenomatosos colônicos, sendo que na PAFA a quantidade de pólipos é inferior a cem. Mutações germinativas no gene *APC* estão associadas a ambas as síndromes, PAF e PAFA, podendo variar o fenótipo de acordo com a região do gene onde se encontra a mutação. Mais recentemente, em 2002, uma nova síndrome autossômica recessiva de oligopolipose colônica associada a alterações no gene *MUTYH* (também chamado *MYH*) foi descrita na literatura e foi chamada de Polipose Associada a *MUTYH* (PAM). Clinicamente, pacientes com PAM apresentam características similares à de indivíduos com PAFA ou PAF. A polipose colônica em pacientes com PAM pode apresentar pólipos adenomatosos ou mistos (adenomatosos e hiperplásicos), o que dificulta o diagnóstico clínico da síndrome. A análise molecular do gene demonstra que duas mutações de ponto, p.Y179C e p.G396D, são as mais frequentes em pacientes com PAM na Europa Ocidental e América do Norte, correspondendo a 80% das mutações encontradas em *MUTYH*. Aproximadamente 1% de todos os pacientes com câncer colorretal apresentam alterações em *MUTYH* e, mais de um terço desses casos, pode vir a desenvolver CCR na ausência de múltiplos adenomas, sobrepondo assim os critérios clínicos de outras síndromes, como os critérios de Bethesda da SL. Entretanto, o risco de recorrência é muito diferente entre as síndromes, o que torna fundamental a diferenciação entre PAM, SL-Bet e PAF/PAFA em termos de aconselhamento genético. Embora autossômica recessiva, a PAM com herança pseudodominante pode ser esperada, especialmente na presença de consangüinidade nas famílias afetadas.

Visando uma melhor compreensão das características dos pacientes portadores das mutações comuns em grupos de risco para a síndrome, foram incluídos 75 pacientes com diferentes critérios clínicos para as síndromes de predisposição hereditária ao CCR: 15 pacientes com PAM, 15 pacientes com FAP, 30 pacientes com SL (15 com critérios

Amsterdam II e 15 com critérios sugestivos Bethesda) e 15 pacientes com CR esporádico (diagnóstico de CCR acima dos 60 anos). O DNA genômico foi isolado a partir da fração leucocitária de sangue periférico e as análises moleculares foram realizadas por PCR-Tempo Real (ensaio TaqMan) para detecção das mutações Y179C e G396D, confirmadas posteriormente por análise de sequenciamento. Mutações germinativas no gene *MUTYH* foram identificadas em cinco pacientes: quatro pacientes com mutações bi-alélicas e um paciente heterozigoto. Destes cinco pacientes, um heterozigoto p.G396D e um homozigoto p.Y179C preenchem critérios clínicos de PAF-clássica e os outros três pacientes (um homozigoto p.G396D, um heterozigoto p.G396D e um heterozigoto p.Y179C) preenchem os critérios de PAM. Este é o primeiro estudo acerca da frequência de mutações germinativas comuns no gene *MUTYH* em famílias brasileiras com câncer colorretal. Atualmente, o diagnóstico clínico de síndromes de predisposição hereditária ao câncer colorretal é complexo e requer análise detalhada da história familiar do paciente e das características clínico-patológicas da lesão. Nesta série de casos, o rastreamento das mutações comuns de *MUTYH* p.G396D e p.Y179C seguida de seqüenciamento dos casos que apresentam um dos alelos acometidos apenas, parece ser uma estratégia inicial interessante de investigação molecular de famílias com critérios para as síndromes MAP e FAP.

## INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) configura-se como a terceira causa mais comum de câncer no mundo em ambos os sexos e a segunda causa em países desenvolvidos. Cerca de 9,4% de todos os tumores novos diagnosticados no mundo a cada ano, equivalendo a um milhão de casos, são colorretais. No Brasil, o CCR está entre as seis neoplasias malignas mais comuns e segundo publicação do Instituto Nacional do Câncer (INCA) a estimativa de casos novos de câncer colorretal para o ano de 2010 no Brasil é de 13.310 casos em homens e de 14.800 em mulheres. Na região Sul é o terceiro tumor mais frequente em homens (21/100.000) e o segundo mais frequente em mulheres (22/100.000) (Estimativa 2010-Incidência de câncer no Brasil, Inca).

Os fatores de risco para CCR incluem obesidade, dieta pobre em frutas e vegetais, sedentarismo e tabagismo. O risco médio ao longo da vida para uma pessoa desenvolver CCR, sem história pessoal ou familiar da doença e com idade acima dos 50 anos é de 5-6%. Isso aumenta em até 20% quando há o envolvimento de familiares de primeiro e/ou segundo grau com diagnóstico de CCR, e chega a um risco de 80-100% em síndromes hereditárias, como a Síndrome de Lynch (SL) e a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (Rustgi *et al.*, 2007). Cerca de 5-10% de todos os casos de câncer colorretal (CCR) são causados por mutações em genes de alta penetrância que causam síndromes hereditárias, como a Síndrome de Lynch (SL) (Abel-Rahman *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2009).

A carcinogênese colorretal é a melhor compreendida dentre as neoplasias humanas e se caracteriza pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas em diversos genes supressores de tumor, oncogenes e genes associados ao reparo de erros de pareamento do DNA, resultando em expansão clonal neoplásica (Cravo *et al.*, 1999; Fearon *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1998).

O câncer colorretal é tradicionalmente dividido em esporádico e familiar (hereditário), e representa uma doença complexa cujo desenvolvimento é determinado por diferentes combinações de fatores genéticos e ambientais.

Mutações raras e altamente penetrantes em genes relacionados ao câncer podem agir com uma pequena influência ambiental, enquanto uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais ocorre no desenvolvimento do ccr esporádico. Diversos estudos epidemiológicos destacaram o papel da dieta e do estilo de vida no risco do CCR nos últimos 40 anos. Foram relatadas correlações positivas com a ingestão de gorduras, carnes vermelhas e bebidas alcoólicas, bem como o fumo, assim como a correlação inversa com a ingestão de verduras e fibras (Naccarati *et al.*, 2007).

O reconhecimento do caráter hereditário do CCR é importante pela possibilidade de prevenção por excisão de lesões pré-malignas e pelo impacto prognóstico favorável que se associa ao diagnóstico precoce destas neoplasias. Cerca de 15-20% dos tumores colorretais são hereditários. A forma mais freqüente de câncer colorretal hereditário é a Síndrome de Lynch, também chamada HNPCC (Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer). Trata-se de uma doença genética de herança autossômica dominante com alta penetrância (80-90%) apresentando uma incidência de 1:1000 indivíduos nos Estados Unidos (Buttin *et al.*, 2004; Aaltonen and de la Chapelle, 1999; Umar *et al.*, 2004).

Sabe-se que mutações germinativas em um dos principais genes do sistema MMR (Mismatch Repair) de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2) causam a síndrome de Lynch (SL), com uma penetrância aproximada de 80% para CCR, 60% para câncer de endométrio e até 20% para os outros tipos de tumores, como endométrio, ovário, estômago, trato urinário, pâncreas, intestino delgado, trato hepatobiliar e/ou cérebro (Avdel-Rahman *et al.*, 2008; Balaguer *et al.*, 2007; de la Chapelle, 2004; Vasen, 2005; Arnold *et al.*, 2005; Buttin *et al.*, 2007; Hadley *et al.*, 2008).

Além da Síndrome de Lynch, o câncer colorretal hereditário também pode estar associado a síndromes polipóides. Estas constituem um grupo heterogêneo com diferentes manifestações clínicas, mas têm em comum a ocorrência de múltiplos pólipos no trato gastrointestinal, geralmente associada a aumento do risco para câncer colorretal (Schulmann *et al.*, 2007). Dentre elas encontra-se a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), que possui padrão de herança dominante e é causada por mutações germinativas no gene APC. A PAF possui como característica o desenvolvimento de centenas a milhares de pólipos ao longo do cólon e reto, envolvendo freqüentemente manifestações extracolônicas como adenomas duodenais, hipertrofia do epitélio pigmentar da retina, osteomas, cistos epidermóides, adenomas e carcinomas adrenais, tumores de tireóide, tumores desmóides e dentição anormal. Em contraste, a Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA) possui como característica a presença de menos de cem pólipos no cólon que se desenvolvem preferencialmente no lado direito.

Em 2002, uma nova síndrome autossômica recessiva de oligopolipose colônica foi descrita por Al Tassan *et al.*, envolvendo o gene homólogo de MutY (MYH ou MUTYH), e foi chamada de Polipose Associada a MUTYH (PAM). Clinicamente, PAM resulta no desenvolvimento precoce de múltiplos pólipos adenomatosos ao longo do intestino, porém também pode ocorrer o aparecimento de tumores na ausência de pólipos em idade jovem, o que sobrepõe o fenótipo da Síndrome de Lynch. O fenótipo é na maioria das vezes sugestivo de PAFA, mas pode também se sobrepor ao da PAF-clássica o que torna a distinção entre estas variantes fundamental na avaliação dos riscos para o indivíduo e seus familiares. Ainda não há estudos de base populacional sobre a penetrância do câncer

colorretal em portadores da síndrome PAM e em estudos atuais não foram encontradas mutações bialélicas em grupos controles, o que sugere uma penetrância próxima a 100%. (Lindor *et al.*, 2009). Uma meta-análise realizada por Cleary *et al.* demonstrou que portadores homozigotos e heterozigotos compostos de mutações em MUTYH possuem um risco 20 vezes maior (OR, 20.7; 95% CI's, 2.8–153) de desenvolver CCR em relação a população em geral. (Cleary *et al.* 2009).

## REVISÃO TEÓRICA

### 1. EPIDEMIOLOGIA

O câncer colorretal (CCR) é o terceiro tumor maligno mais comum no mundo em ambos os sexos e o segundo em países desenvolvidos. Cerca de 9,4% de todos os novos diagnósticos de câncer a cada ano, equivalendo a um milhão de casos, são tumores colorretais. No Brasil, o CCR está entre as seis neoplasias malignas mais comuns e segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA), a estimativa de casos novos de câncer colorretal para o ano de 2010 no Brasil é de 13.310 e 14.800 casos em homens e mulheres, respectivamente. Na região Sul, o CCR é o terceiro tumor mais frequente em homens (21/100.000) e o segundo mais frequente em mulheres (22/100.000) (Inca, 2010).

O risco cumulativo vital de câncer colorretal (CCR), na ausência de história familiar para a neoplasia é de 5-6%. Esse risco aumenta em até 20% quando há história de diagnóstico em familiares de primeiro e/ou segundo grau e chega a 80-100% em indivíduos diagnosticados com as síndromes hereditárias de predisposição ao CCR, como a Síndrome de Lynch (SL) e a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (Rustgi., 2007; Jasperson *et al* 2010). As síndromes hereditárias de CCR, primariamente causadas por mutações em genes de alta penetrância, são responsáveis por cerca de 5-10% de todos os casos de câncer colorretal (CCR) (Abel-Rahman *et al.*, 2008; Lynch *et al.*, 2009).

### 2. FATORES DE RISCO

O câncer colorretal é tradicionalmente classificado em esporádico e familiar (hereditário), e representa uma doença complexa cujo desenvolvimento é determinado por diferentes combinações de fatores genéticos e ambientais. Mutações raras e altamente penetrantes em genes relacionados ao câncer associadas a uma influência pequena a moderada de fatores de risco ambientais, estão associadas as formas hereditárias de CCR, enquanto uma complexa interação de fatores genéticos e ambientais se associa ao desenvolvimento do CCR esporádico. Sedentarismo, excesso de peso corporal e acúmulo de gordura abdominal são descritos como fatores de risco consistentes. Diversos estudos epidemiológicos destacaram o papel da dieta e do estilo de vida com o risco de CCR nos últimos 40 anos. Foram relatadas correlações positivas com a ingestão de gorduras, carnes vermelhas, bebidas alcoólicas e fumo, assim como uma correlação de risco inversa com a ingestão de verduras e fibras (Naccarati *et al.*, 2007; Giovannucci, 2002).



Até o final do século XIX, ficou claro que a exposição ocupacional e estilo de vida estão intimamente ligados e, aparentemente, são as causas de alguns tipos de câncer (Weinberg, 2006). A importância dos fatores ambientais foi estabelecida pela substancial variação geográfica na incidência do câncer do cólon, pelo aumento consistente da incidência nas populações em fase de desenvolvimento econômico ou “ocidentalização”, e pelos aumentos marcantes na incidência de câncer colorretal observados em grupos que migraram de áreas de baixa para alta incidência (Giovannucci *et al*, 2002).

## **2.1 Dieta como fator de risco para CCR.**

Cerca de duas décadas atrás, Doll e Peto, usando comparações internacionais da prevalência de exposição e das taxas da doença, estimaram que até 90% dos cânceres colorretais podem ter uma contribuição principalmente da alimentação. (Giovannucci, 2002)

As vias moleculares destas associações epidemiológicas ainda são pouco compreendidas, mas a produção de aminas heterocíclicas durante o preparo de carnes, o estímulo provocado pelos altos níveis de ácidos biliares fecais e a produção de espécies reativas de oxigênio, tem sido apontadas como possíveis mecanismos desencadeadores destas vias (Dingley *et al.*, 1999; Owen *et al.*, 1998). Vegetais com potencial anticarcinogênico e que possuem em sua composição o folato, antioxidantes, indutores de enzimas desintoxicantes, ligantes de carcinógenos luminais que faz com que o trânsito intestinal seja mais rápido, podem explicar algumas das associações inversas (Hamilton *et al.*, 2000).

### **2.1.1 Frutas e Vegetais**

Diversos estudos realizados sobre o consumo de frutas e vegetais e o risco de CCR, demonstram associação inversa entre o consumo elevado destes e o risco de CCR (Potter *et al.*, 1993; Steinmetz and Potter, 1996), se estendendo inclusive para o risco de desenvolver adenomas (Michels *et al.*, 2006). Os vegetais possuem uma grande quantidade de micronutrientes com atividades antioxidantes, como os carotenóides e ascorbatos, e outros componentes bioativos com uma variedade de componentes anticarcinogênicos, como os fenóis, flavonóides, isotiocianatos, e indóis (Steinmetz and Potter, 1991). Estudos sobre a relação das fibras com o risco de CCR são inconsistentes, talvez devido a sua natureza heterogênea e das diferentes maneiras pelas quais a sua ingestão é medida em nossa dieta (WRCF Panel, 1997; Potter, 1999b).

Outros nutrientes tem sido estudados para explicar uma possível redução do risco associada com os vegetais (Steinmetz and Potter, 1996). Em 1991, um estudo caso-controle realizado por Freudenheim e colaboradores (1991) encontrou um baixo risco associados a ingestão elevada de folato, propondo desta forma a hipótese do folato/CCR (Freudenheim *et al.*, 1991) e, em 1995, outro estudo encontrou um aumento do risco de CCR entre homens com a combinação de baixa ingestão de folato e metionina e a alta ingestão de álcool (Giovannucci *et al.*, 1993).

A associação entre a ingestão de cálcio, presente na dieta diária, e a neoplasia colorretal também tem sido explorada epidemiologicamente. O cálcio pode influenciar na redução da proliferação da parte superior da cripta colônica, reduzindo crescimento de adenomas metacrônicos (Bostick *et al.*, 1995; Hyman *et al.*, 1998). Um ensaio clínico duplo-cego, randomizado comparando ingestão de 1200mg de cálcio elementar por dia com placebo mostrou uma redução de 15-20% na incidência de adenomas colorretais metacrônicos (Baron *et al.*, 1999). A interação entre o cálcio e a vitamina D tem sido amplamente discutida, uma vez que diversos estudos demonstraram a redução do risco de adenomas com a administração suplementar de cálcio, especialmente em pacientes com altos níveis de vitamina D. (Grau *et al.*, 2003; Hartman *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2004; Flood *et al.*, 2005)

## **2.2 Álcool**

Fortes evidências epidemiológicas indicam que o consumo elevado de álcool aumenta o risco de câncer colorretal, mas ainda é desconhecido o mecanismo pelo qual o álcool aumenta este risco. Uma das hipóteses se relaciona com o antagonismo de um dos principais metabólitos do álcool, acetaldeído, no metabolismo do folato e da metionina (Berx, 1998; Bhathal, 1996; Bianchi, 1993). O acetaldeído é um potente formador de adutos de DNA, podendo também inibir o seu reparo (Farinati *et al.*, 1998). A deficiência de folato pode ter efeitos similares. (Garro and Lieber, 1990; Giovannucci *et al.* 1995)

## **2.3 Tabaco**

O tabaco é um outro fator de risco, que até relativamente pouco tempo, não era associado ao desenvolvimento de tumores colorretais malignos (Slattery *et al.*, 1990). No entanto, risco elevado para adenomas colorretais foi demonstrado entre fumantes em uma série de estudos que levaram a uma reavaliação da relação entre fumo e câncer colorretal (Hamilton, 2000). Dois grandes estudos de coorte sugeriram um longo período de indução

entre o tempo de exposição ao tabaco e o risco subsequente de CCR (Giovannucci 2002, 1994). Dados mais recentes sugerem que o fumo pode estar fortemente associado ao desenvolvimento de CCR com instabilidade de microssatélites (IMS) (Slattery *et al.*, 2000) e perda de expressão do gene hMLH1 (Lüchtenborg *et al.*, 2005).

#### **2.4 Medidas Antropométricas e atividade física**

A relação entre CCR e medidas antropométricas como o índice de massa corporal (IMC), foi estudada por múltiplos grupos de pesquisa e os resultados demonstraram existir relação entre o IMC elevado e o risco aumentado para CCR em homens. Para mulheres os dados são menos consistentes (Potter *et al.*, 1993; WRCF Panel, 1997). Dados provenientes de um estudo realizado por Framingham mostraram que a medida da circunferência abdominal é um boa preditora do risco de CCR ao longo da vida tanto em homens quanto mulheres (Moore *et al.*, 2004).

A relação entre a atividade física e redução do risco de CCR está entre os mais consistentes dados sobre fatores de risco para essa neoplasia, sendo descrita em estudos de atividade ocupacional e lazer (Potter *et al.*, 1993; WCR 1997). Uma das hipóteses levantadas para explicar esse efeito protetor propõe que a atividade física estimula os movimentos peristálticos do cólon, diminuindo assim o tempo em que o conteúdo do cólon se mantém em contato com o epitélio (Potter *et al.*, 1993).

#### **2.5 Inflamação Crônica**

Doenças inflamatórias intestinais (DII) são fatores etiológicos significantes no desenvolvimento do adenocarcinoma colorretal (Hamilton, 2000). O risco aumenta após 8 a 9 anos de doença ativa e é mais elevado em pacientes com início precoce e manifestação generalizada. Mais de 5% de todos os casos de CCR em pacientes com menos de 50 anos ocorrem devido a doença inflamatória intestinal. As principais formas de DII são a colite ulcerativa e a doença de Crohn (Broome *et al.*, 1992).

A colite ulcerativa é etiológicamente conhecida por afetar crianças e adultos, com um pico de incidência no início da terceira década. É considerada uma desordem pré-maligna, sendo sua duração e a extensão um dos maiores fatores de risco. Estudos de base populacional mostram um aumento na mortalidade (4 vezes maior) por carcinoma colorretal em indivíduos com a doença. Em estudos clínicos, o aumento na incidência é geralmente maior, até 20 vezes (Hamilton, 2000).

A Doença de Crohn está associada ao desenvolvimento de carcinoma de intestino delgado e cólon. O risco de desenvolver CCR é aparentemente três vezes superior ao risco de indivíduos não afetados pela doença (Gillen, 1994).

As doenças inflamatórias intestinais (DII) podem aumentar o risco de câncer colorretal devido à perda da borda em escova do trato intestinal, possivelmente levando a estímulo proliferativo para células-tronco em contato com o fluxo fecal sem que haja a necessidade de formação de um adenoma prévio (Potter, 1999a). A exposição a espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como os processos associados com a inflamação, são mecanismos explicativos plausíveis (Itzkowitz and Yio, 2004; Munkholm, 2003)

## **2.6 Fatores Modificadores do risco de CCR**

Medicamentos anti-inflamatórios não esteróides e alguns compostos naturais bloqueiam as alterações bioquímicas na homeostase da prostaglandina em neoplasias colorretais. Alguns destes agentes causam uma dramática involução dos adenomas, porém seu papel na quimioprevenção do adenocarcinoma ainda não está clara. Alguns polimorfismos em enzimas-chave podem alterar outras vias metabólicas modificando componentes protetores ou prejudiciais, como por exemplo metileno-tetra-hidrofolato redutase, N-acetiltransferases, Glutathione-S-transferases, Aldeído desidrogenase e Citocromo P-450 (Slattery 1999; Heinimann, 1999; Murata, 1999). Estes polimorfismos poderiam explicar a susceptibilidade individual ou a variação na predisposição ao CCR entre populações com exposição similar (Rafter, 1998).

Os anti-inflamatórios não esteróides (AINES), suprimem a atividade da enzima COX-2 (Kalgutkar *et al.*, 1998) e são capazes de inibir o crescimento de pólipos mesmo em pacientes com polipose adenomatosa familiar (PAF). A inibição da COX-2 reduz a formação de prostaglandinas a partir do ácido araquidônico, diminuindo a proliferação epitelial, estimulando o processo de apoptose (Barnes *et al.*, 1998), e reduzindo a angiogênese (Tsuji *et al.*, 1998). A inflamação crônica é um processo frequente e relevante na etiologia do CCR, como evidenciado pela relação de risco entre a neoplasia e DII, especialmente colite ulcerativa. Estudos recentes também indicam que mediadores do processo inflamatório, como por exemplo níveis elevados de proteína-C reativa, podem ser utilizados como biomarcadores de risco para CCR. (Gunter *et al.*, 2006).

## **2.7 História Familiar**

A história familiar da doença confere um significativo aumento do risco para os familiares. Desta maneira se torna necessário classificar as famílias e identificar aqueles indivíduos que são susceptíveis a serem portadores de uma mutação germinativa em algum gene relacionado a síndrome, conferindo um risco elevado de desenvolver câncer ao longo da vida. Aqueles com um risco genético razoavelmente elevado que se encontram com risco moderado e, portanto, alvo de uma triagem adequada (Firth, 2005)

Diversas ferramentas estão disponíveis para auxiliar no diagnóstico clínico das síndromes de predisposição hereditária ao câncer de cólon. Para esta análise é importante a história familiar, testes no tumor, modelos de probabilidade de mutação, e testes genéticos em si. Para isso é importante se obter um detalhado histórico pessoal e familiar. Fatores específicos indicam os pacientes em risco para desenvolver os tumores presentes no espectro da síndrome (Jasperson, 2010; Firth, 2005)

## **3. CARCINOGENESE COLORRETAL**

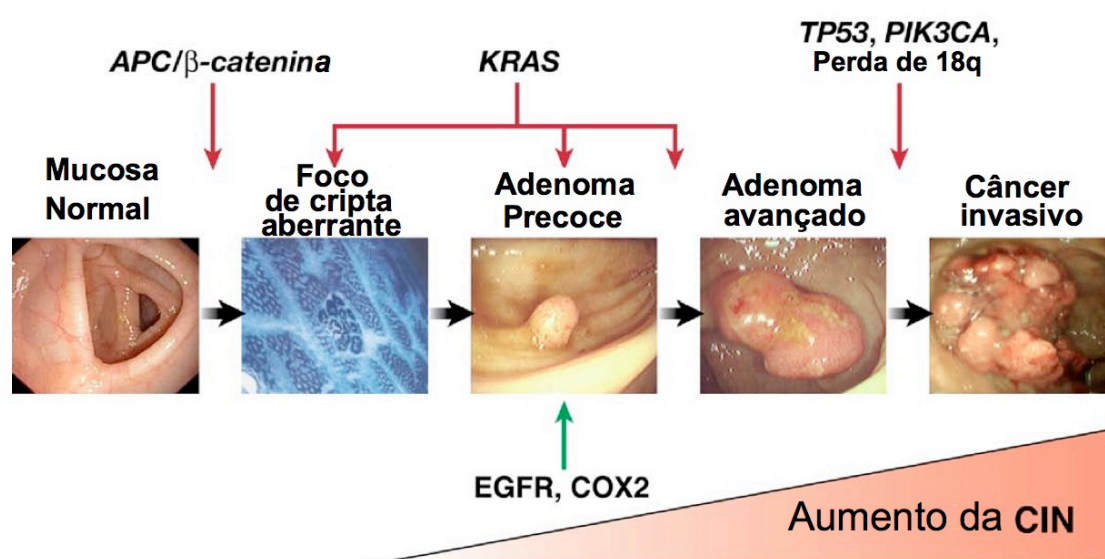
A carcinogênese colorretal é a melhor compreendida dentre as neoplasias humanas e se caracteriza pelo acúmulo de mutações e alterações epigenéticas em diversos genes supressores de tumor, oncogenes e genes associados ao reparo de erros de pareamento do DNA, resultando em expansão clonal neoplásica (Cravo *et al.*, 1999; Fearon *et al.*, 1990; Fujiwara *et al.*, 1998).

Fearon e Vogelstein, em 1990, propuseram um modelo de carcinogênese em múltiplas etapas denominado “Sequência Adenoma-Carcinoma”. Este modelo propõe que as mutações nos genes supressores de tumor e oncogenes, que levam ao desenvolvimento do CCR, ocorrem em uma ordem específica. Na descrição inicial do processo por Fearon e Vogelstein as principais alterações moleculares foram descritas na seguinte sequência adenoma-carcinoma: o primeiro evento é a inativação do gene *APC* o que leva a um crescimento celular anormal. Na etapa seguinte ocorre a deleção do gene supressor de tumor *DCC* (deleted in colorectal carcinoma) e de outros genes localizados próximos a ele no braço longo do cromossomo 18. A última etapa na progressão para carcinoma é a perda de uma região específica em 17p, onde se encontra o gene *TP53*.

Desde a descrição deste primeiro modelo, vários autores sugeriram a existência de múltiplas vias de carcinogênese, demonstrada pela observação de diferentes características clinicopatológicas e genéticas em CCR. Dos vários modelos genéticos de desenvolvimento do CCR atualmente descritos destacam-se, pela sua frequência, os designados por via da

instabilidade cromossômica (Cromossomal instability pathway - CIN) ou via supressora, via da instabilidade de microssatélites (Microsatellite instability pathway - MIN) ou via mutadora (Ilyas *et al*, 1999; Narayan *et al*, 2003; Takayama *et al*, 2006). Outra via carcinogênica além da sequência adenoma-carcinoma tradicional, foi descrita recentemente e chamada de via neoplásica serrilhada (Snover *et al*, 2005). O acúmulo de alterações somáticas nos pólipos sésseis serrilhados, tais como mutações ativadoras de BRAF e metilação generalizada de ilhas CpG (referido como o fenótipo metilador de ilhas-CpG), com ou sem MSI, são eventos importantes nesta via carcinogênica (Jasperson *et al.*, 2010).

**Fig. 1 - Sequência Adenoma-Carcinoma**



Reproduzido de Takayama *et al*, 1998, por PINO and Chung, 2010 e readaptado)

Outra conhecida via alternativa da carcinogênese colorretal e que se estima ser responsável por aproximadamente 20% dos carcinomas colorretais, se desenvolve a partir de um grupo de pólipos com perfil histológico diferenciado, conhecido como pólipo serrilhado (Jass, 2007). Os tumores desenvolvidos através desta via, podem apresentar diversos perfis moleculares. Um destes perfis relacionados com a via dos pólipos serrilhados, apresenta como uma das características a metilação de ilhas CpG's, no entanto, não se trata de uma característica específica desta via, uma vez que também é encontrada em uma proporção de carcinomas colorretais da via convencional (adenoma-carcinoma) ou APC (Chirieac *et al.*, 2005).

### 3.1. Instabilidade Cromossômica

A via de instabilidade cromossômica (CIN - Chromosomal instability) é observada em 65-70% dos CCR esporádicos, e está associada a acelerada taxa de ganhos ou perdas de parte ou grandes porções dos cromossomos, resultando em uma grande variabilidade cariotípica de célula para célula (Lengauer *et al*, 1998). A consequência da CIN é um número desbalanceado de cromossomos (aneuploidia), que pode incluir amplificação genômica em regiões específicas e alta frequência de perda de heterozigosidade (LOH, do inglês Loss of heterozygosity). (Pino and Chung, 2010). Juntamente com as alterações cariotípicas observadas em tumores com instabilidade cromossômica, são encontradas múltiplas mutações em genes supressores de tumor e oncogenes específicos (Tabela 1). Estas mutações ativam vias oncogênicas críticas para a patogênese do CCR. Ainda não está claro se a via CIN cria o ambiente adequado para o acúmulo destas mutações, ou vice-versa (Pino and Chung, 2010).

Tabela 1. Prevalência Global de Mutações genéticas em CCR - CIN positivos

Gene	Localização Cromossômica	Prevalência de Mutações [%]	Função do Produto do Gene
<b>Oncogenes</b>			
<i>KRAS</i>	12p12	~ 30–50	Proliferação Celular, sobrevivência e transformação;
<i>CTNNB1</i>	3p22	~ 4–15 (~50a)	<i>Regulação de genes alvo da via Wnt que promovem o crescimento do tumor e invasão;</i>
<i>PIK3CA</i>	3q26	~ 20	Proliferação celular e sobrevivência;
<b>Genes Supressores de Tumor</b>			
<i>APC</i>	5q21	~ 30–70	Inibição da via de sinalização Wnt e regulação do citoesqueleto;
<i>TP53</i>	17p13	~ 40–50	Parada do ciclo celular e indução da apoptose;
<i>SMAD4, SMAD2</i>	18q21	~ 10–20	<i>Mediadores intracelulares da via de TGF-<math>\beta</math></i>
<i>DCC</i>	18q21	~ 6	Receptor de superfície celular para netrin-1

*Identificado em 50% dos tumores sem mutações em APC*

*TGF- $\beta$  - Fator de transformação de crescimento  $\beta$ .*

Adaptado de Pino and Shung, 2010.

### 3.2 Instabilidade de Microssatélites

A via de carcinogênese colorretal por instabilidade de microssatélites (MIN) se caracteriza por falha ou deficiência no sistema MMR de reparo do DNA. Há acúmulo de substituições de bases na sequência de DNA e/ou inserções-deleções em sequências

curtas repetidas do genoma chamadas microssatélites, ocasionando perda ou ganho de unidades de repetição nestas regiões. Este fenômeno de alteração no número de repetições é denominado instabilidade de microssatélite (IMS) (Abdel-Rahman *et al.*, 2008). Mutações derivadas de um sistema MMR deficiente poderiam afetar genes importantes para a regulação do crescimento celular, em especial aqueles que possuem seqüências repetidas (microssatélites) (Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2008). A instabilidade de microssatélites pode ser demonstrada em cerca de 90% dos tumores associados à síndrome de Lynch. Porém, a presença de IMS no tecido tumoral, considerada característica típica da síndrome de Lynch, é observada também em aproximadamente 15% dos casos de CCR esporádico (Lagerstedt Robinson *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2005).

#### **4. PATOLOGIA**

A grande maioria (98%) dos tumores colorretais são adenocarcinomas, que se caracterizam na anatomia patológica pela presença de células de Paneth espalhadas, células neuroendócrinas ou pequenos focos de diferenciação de células escamosas. A maioria dos carcinomas colorretais são localizados no cólon sigmóide e reto (Thomas *et al.*, 1995). No entanto, a patologia molecular tem mostrado que tumores com altos níveis de instabilidade de microssatélites (IMS) ou com mutações no proto-oncogene ras se desenvolvem mais frequentemente no ceco, cólon ascendente e cólon transversal (Jass *et al.*, 1998; Rashid *et al.* 1995; Tang *et al.* 1999).

##### **4.1 Morfologia**

A imensa maioria dos carcinomas colorretais tem origem em adenomas pré-existentes. Estima-se que esta progressão possa levar de cinco a dez anos ou até mais (Rosito *et al.*, 2005). Este processo é mais comum quando o adenoma é classificado histologicamente como viloso ou túbulo-viloso, pois os adenomas tubulares quase nunca sofrem malignização, isto é, são desprovidos de potencial evolutivo, mas são considerados indicadores de um epitélio colônico com risco proliferativo. Entretanto a ocorrência do carcinoma colorretal sem evidência de precursores adenomatosos sugere que algumas lesões displásicas podem degenerar em direção à malignidade sem passar por um estágio polipóide (Rosito *et al.*, 2005; Liu, 2005).

As síndromes associadas ao CCR são definidas com base nas características clínicas, patológicas e, mais recentemente, genéticas. Algumas destas condições apresentam como característica o desenvolvimento de pólipos adenomatosos, que podemos ver manifesta na síndrome de Lynch (também chamado de câncer colorretal não polipomatoso hereditário), na polipose adenomatosa familiar (FAP), na FAP atenuada, e na polipose associada a



*MUTYH* (PAM). Pólipos hamartomatosos são lesões primárias em Peutz-Jeghers e na Síndrome da polipose juvenil. Finalmente, a polipose hiperplásica é uma condição incomum, que tem um risco substancial de câncer e deve ser diferenciado de outras condições.

#### **4.2 Pólipos de intestino e sua relação com câncer colorretal.**

Os pólipos são projeções da superfície da mucosa intestinal e são classificados usualmente por suas características histológicas. A classificação macroscópica tem valor limitado na determinação do seu manejo. Eles podem ser classificados em duas grandes classes, Neoplásicos e Não-neoplásicos. Dentre os pólipos neoplásicos estão os adenomas, lipomas e leiomiomas. Dentre os não neoplásicos estão os pólipos hamartomatosos que podem ser sugestivos da Síndrome de Peutz-Jeghers ou da Polipose Juvenil. Ainda incluídos neste grupo se encontram os pólipos hiperplásicos/metaplásicos, inflamatórios/pseudopólipos e os pólipos linfóides benignos (Rosito *et al*, 2005).

##### **4.2.1 Adenomas**

São os pólipos neoplásicos mais frequentemente encontrados e apresentam grande importância clínica devido ao seu papel como precursor do câncer colorretal (Rosito *et al*, 2005). Os adenomas são neoplasias intraepiteliais que variam de lesões pequenas e frequentemente pediculadas a grandes neoplasias geralmente sésseis. A prevalência dos adenomas colônicos é de cerca de 20-30% antes dos 40 anos de idade, aumentando para 40-50% após os 60 anos, sem distinção de sexo.

A maior parte dos tumores advém de adenomas que podem ser diagnosticados e removidos endoscopicamente, o que auxilia o profissional gastroenterologista oferecendo maior eficiência no momento de intervir nos processos naturais de progressão do câncer (Yantiss, 2007).

Os pólipos adenomatosos são classificados em três subtipos, os adenomas tubulares, adenomas vilosos e os túbulos-vilosos, entretanto existe uma considerável sobreposição entre estas categorias, por isso se convencionou que adenomas tubulares são os que exibem aspecto tubular em mais que 75% da sua estrutura, adenomas vilosos têm aspecto viloso em mais que 50% da estrutura e adenomas tubulos-vilosos tem estrutura vilosa em 25-50% de sua extensão. Os adenomas tubulares são os mais comuns, cerca de 5-15% dos adenomas são túbulo-vilosos e somente 1-10% são vilosos. (Liu, 2005; Rosito *et al*, 2005).

#### **4.2.1.1 Adenomas Tubulares**

O adenoma tubular faz parte de um dos três tipos de pólipos adenomatosos, considerado também como o menos perigoso entre eles, pois possui menor risco de se tornar cancerígeno. Deve-se ressaltar que a aparência desses pólipos é aveludada e possui diversas projeções digitiformes, denominadas vilosidade no epitélio, pelas quais são mais comuns de se encontrar no reto.

Vale lembrar que a maior parte dos adenomas tubulares não são cancerígenos, mas passam a ter risco quando crescem de tamanho, propiciando maiores riscos e problemas. Destaca-se ainda que o tubular cresce e pode se tornar sésseis aumentando os riscos de câncer de cólon (Leggett 2010).

A grande maioria dos adenomas tubulares são encontrados no cólon, mas podem ocorrer também no estômago e intestino delgado, especialmente próximos a ampola de Vater. Os adenomas menores apresentam contorno liso e são sésseis, enquanto os maiores tendem a ser grosseiramente lobulados e apresentam hastes delgadas. Histologicamente a haste é composta por tecido fibromuscular e proeminentes vasos sanguíneos (derivados da submucosa) e é geralmente coberta por mucosa normal, não-neoplásica. No entanto, o epitélio adenomatoso pode se estender em direção à haste e para dentro das regiões adjacentes da mucosa.

Sendo pequenas ou grandes as lesões adenomatosas são compostas por epitélio neoplásico (displásico), que reveste as glândulas sob a forma de um epitélio alto, hiper Cromático, às vezes um pouco desarrumado, que pode ou não mostrar vacúolos de mucina (Liu, 2005; Rosito et al, 2005).

#### **4.2.1.2 Adenomas Vilosos**

São os pólipos epiteliais maiores e mais perigosos. Tendem a ocorrer em pessoas mais idosas, mais comumente no reto e no cólon retossigmóide, mas podem se localizar em qualquer lugar. Geralmente são sésseis, tem até 10cm de diâmetro e são massas aveludadas ou em forma de couve flor, que se projetam entre um e três centímetros acima da mucosa normal circunjacente (LIU, 2005; ROSITO et al, 2005).

Os adenomas vilosos estão ligados com mais frequência a adenomas maiores e de grau mais sério de displasia, sua ocorrência predomina no reto e retossigmóide. Não obstante, podem ocorrer em qualquer parte do cólon. Na maioria das vezes são estruturas sésseis que aparecem como aveludadas ou projeções cauliflowerlike (Ranji, 2009).

Muito embora, os adenomas vilosos sejam considerado raros, podem ocorrer no duodeno e intestino delgado. Os adenomas vilosos devem ser considerados motivo de

preocupação, em função do risco que propicia em se tornar maligno (cerca de 15-25% em geral, mas mais uma vez > 2 cm) (Ranji, 2009).

Sua histologia mostra expansões vilosas da mucosa cobertas por epitélio colunar displásico, às vezes muito desorganizado. Quando surge um carcinoma invasor, não há haste e a invasão ocorre diretamente para dentro da parede do cólon (submucosa ou camadas mais profundas) (Liu, 2005; ROSITO et al, 2005).

#### **4.2.1.3 Adenomas Túbulo-vilosos**

São tipicamente intermediários entre as lesões tubulares e as vilosas, com relação à existência de haste ou de serem sésseis, ao seu tamanho e ao grau geral de displasia observada. O risco de abrigarem carcinoma in situ ou carcinoma invasivo geralmente se correlaciona com a proporção da lesão que é vilosa. O diagnóstico dos pólipos é dependente da presença de displasia (presença de atipia celular e alterações arquiteturais encontradas ao exame histológico), atualmente, agrupada em displasia de baixo grau, que são caracterizados pela estrutura glandular pouco alterada e com mínimas atipias nucleares (Núcleos Basais) e, adenomas com displasia de alto grau, que apresentam alterações maiores na estrutura glandular - restritas ao epitélio ou a lâmina própria e atipia nuclear moderada a acentuada (núcleos aumentados, hiper cromáticos, irregulares e ocupando o terço superior da glândula) (Liu, 2005; Rosito *et al*, 2005).

#### **4.3 Pólipos Hiperplásicos**

Também conhecidos como pólipos metaplásicos, são os mais frequentemente encontrados no cólon e reto (Rosito *et al*, 2005). Podem ocorrer isoladamente, porém é mais comum serem múltiplos e usualmente sésseis e de coloração pálida ou semelhante à mucosa adjacente. Histologicamente apresentam criptas com aspecto serrilhado, devido às células epiteliais acumuladas e fendas nas criptas. Grandes pólipos hiperplásicos raramente coexistem com focos de alterações adenomatosas, o pólipo hiperplásico comum, pequeno, é considerado como não tendo potencial de malignidade. No entanto, os pólipos hiperplásicos que ocorrem na vigência da rara síndrome da polipose hiperplásica, podem exibir displasia nas células epiteliais (adenomas) e, portanto, são considerados um risco para o desenvolvimento de carcinoma. Estudos realizados posteriormente relacionaram a coexistência de pólipos hiperplásicos e adenomatosos em pacientes portadores de mutações Bi-alélicas no gene MUTYH (Castells, 2008; Boparai *et al.*, 2008).

#### **4.4 Pólipos Serrilhados**

O adenoma serrilhado ou pólipo serrilhado, também denominado adenoma serrilhado séssil, corresponde a uma forma agressiva de pólipo hiperplásico, com potencial para malignidade, de maior tamanho, com localização predominante em cólon direito, o qual pode evoluir para o câncer colorretal com instabilidade microsatélite, por meio de metilação do DNA das ilhas CpG (causada por uma deficiência no gene de reparo mismatch MLH1) e ainda, mutação do gene BRAF no pólipo serrilhado, representando cerca de 15% dos casos de câncer colorretal esporádico (Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, 2008).

Em retrospecto, a prova morfológica do conceito de via do pólipo serrilhado foi fornecido em estudos sobre polipose hiperplásica e, notavelmente, por uma pequena série de casos desta síndrome rara, que descreveu uma variante do pólipo hiperplásico, com uma arquitetura desordenada, que os autores descreveram como adenoma séssil serrilhado (O'Brian, 2007).

Morfologicamente, pólipos sésseis serrilhados consistem em criptas alongadas, resultando em um aumento global na relação epitélio-estroma, pois eles contêm criptas epiteliais com serrilha exagerada, dilatação persistente da superfície luminal para as bases das criptas, e mucosas brotamento ou ramificação lateral acima da muscular. Algumas células epiteliais são distendidas com mucina, enquanto outras contêm microvesículas apicais, similar àquelas observadas no pólipo hiperplásico microvesicular (Yantiss, 2007).

É imprescindível acrescentar que este apresenta uma histologia mucinosa, pois é localizado com mais frequência no cólon direito e se diferencia da Síndrome de Lynch por ocorrer em pacientes idosos com mais de 65 anos (Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva, 2008).

#### **4.5 Pólipos Hamartomatosos**

Os hamartomas representam uma malformação do desenvolvimento tecidual caracterizada pelo arranjo anormal dos tecidos endógenos, epitélio mucoso e lâmina própria, com preponderância de um ou mais destes tecidos. Podem ser congênitos ou adquiridos. Neste grupo são incluídos o pólipo Juvenil e o pólipo de Peutz-Jeghers (Schulmann *et al.*, 2007; Jass, 2008).

Os pólipos juvenis costumam ser grandes (1 a 3 cm de diâmetro), redondos, lisos ou discretamente lobulados, com hastes. Histologicamente a lâmina própria constitui maior parte do pólipo, encerrando numerosas glândulas cisticamente dilatadas com muco e um aspecto mesenquimal da lâmina própria. Em geral, são lesões isoladas e hamartomatosas sem potencial de malignidade. Os polipos de Peutz-Jeghers também são hamartomatosos,

entretanto evoluem o epitélio mucoso, a lâmina própria e a muscular da mucosa. Estas lesões podem ocorrer isoladamente ou sob a forma de múltiplos pólipos. Estes dois tipos de pólipos quando não desenvolvidos de forma isolada podem estar diretamente relacionados às Síndromes de Polipose Juvenil ou a Síndrome de Peutz-Jeghers (Liu *et al* 2005; Rosito *et al.*, 2005).

Os pólipos colorretais apresentam um desafio diagnóstico para o patologista. Individualmente, as síndromes são raras e podem apresentar fenótipos sobrepostos, entretanto os pólipos podem diferir em quantidade e morfologia de acordo com a síndrome. Cada tipo de polipose apresenta suas particularidades, entretanto em alguns casos apenas o diagnóstico molecular as diferencia. Isso ressalta a importância de obter uma descrição precisa do fenótipo.

## 5. SÍNDROME DA POLIPOSE JUVENIL

O desenvolvimento de pólipos classificados como juvenis é relativamente comum no cólon de crianças em geral. A síndrome da Polipose Juvenil (SPJ) pode se manifestar tanto em crianças quanto em adultos com histórico de sangramento retal. Os pólipos podem ser limitados ao cólon ou de forma generalizada, em todo o trato gastrointestinal, porém raramente o estômago é o órgão mais afetado. A SPJ pode apresentar também manifestações extracolônicas, que incluem anomalias do crânio ou do coração, fissura palatina, polidactilia e má-rotação intestinal. Foram descritos alguns grupos familiares com um padrão de herança autossômica dominante, havendo desta forma um aumento do risco para o desenvolvimento de câncer colorretal, sendo o risco cumulativo estimado em 68% aos 60 anos de idade. (Rosito *et al*, 2005; Jass, 2008)

Os tumores colorretais desenvolvidos na síndrome são mucinosos e/ou pouco diferenciados podendo evoluir sem uma transição displásica óbvia. Uma outra forma da polipose Juvenil, porém rara, ocorre na infância e esta associada a diarreia severa, hemorragia, desnutrição, intussuscepção e morte em idade precoce, sem evidências de história familiar (Rosito *et al*, 2005; Jass, 2008).

Na SPJ, o número de pólipos pode variar de 5 a 200. Os pólipos da polipose sindrômica podem diferir morfológicamente dos pólipos da clássica. Os pólipos sindrômicos são atípicos e apresentam multilobulação e apresentam uma relativa diminuição expansão da lâmina própria. A superfície do epitélio pode raramente apresentar erosão (como nos casos de pólipos juvenis únicos), e pode se contabilizar a um foco displásico aumentando o

risco de malignização, além da possibilidade da coexistência de adenomas (Rosito *et al*, 2005; Jass, 2008).

A mucosa aparentemente normal entre os pólipos pode apresentar as primeiras alterações morfológicas, na forma de uma leve inflamação ativa dentro da lâmina própria e uma leve dilatação das criptas edematosas. Como a progressão de pólipos de pequeno porte, pode não ser marcada por uma mudança cística ostensiva e uma persistente inflamação crônica, isto pode tornar estas pequenas lesões clinicamente indistinguíveis de pólipos inflamatórios (Rosito *et al.*, 2005; Jass, 2008).

A maioria das famílias com SPJ apresentam mutação germinativa em qualquer um dos genes a seguir, SMAD4/DPC4 localizados na posição 21 do braço longo do cromossomo 18, ou no gene BMPR1A/ALK3 localizado na posição 23 do braço longo do cromossomo 10. A taxa de frequência de mutações germinativas em SMAD4 pode variar de 20% a mais de 50% em indivíduos com SPJ. Mutações neste gene também foram associadas a pólipos juvenis colorretais atípicos com uma alta relação epitélio/estroma e também com o envolvimento gástrico (Rosito *et al*, 2005; Jass, 2008). Grandes deleções no cromossomo 10q ocorrem em algumas famílias com SPJ, que sugerem envolvimento tanto do gene BMPR1A quanto do gene PTEN na etiologia da doença (Rosito *et al*, 2005; Jass, 2008).

## **6. SÍNDROME DE PEUTZ-JEGHERS**

A síndrome de Peutz-Jeghers, é uma desordem autossômica dominante com expressividade variável, que é distinguida pela presença de pólipos hamartomatosos no trato gastrointestinal, mais especificamente no intestino delgado e pigmentação mucocutânea. São observadas manchas de melanina ao redor da mucosa oral e lábios, em alguns casos também é observado na face e nos dedos com alguma extensão. Se estima que a prevalência na população em geral seja em torno de 1:100.000. A doença apresenta penetrância variável, inclusive dentro da mesma família, enquanto alguns membros apresentam apenas hiperpigmentação outros desenvolvem pigmentação e pólipos hamartomatosos. A doença se manifesta na adolescência e início da vida adulta. O sintoma mais comum é a dor abdominal recorrente em cólica, causada pela intussuscepção de intestino delgado provocada pelos pólipos que, por vezes, evolui para obstrução intestinal podendo ocasionar também sangramento e anemia (Rosito *et al*, 2005; Kopacova *et al*, 2009).

Atualmente, mutações causadoras da síndrome de Peutz-Jeghers, foram descritas no gene *STK11* (Proteína serina/Treonina Cinase11), localizado no cromossomo 19p.13.3.

O gene codifica uma Serina/Treonina Cinase multifuncional que é importante na transdução de sinal do segundo mensageiro. Ela modula a proliferação celular, controla a polaridade celular e parece ter um importante papel na resposta aos baixos níveis de energia celular. Já existem testes genéticos disponíveis para detecção de mutações no gene *STK11*, mas este apresenta sensibilidade variável, em casos familiares é de 70% e em casos esporádicos a sensibilidade varia de 30 a 67%. Mutações no gene supressor de tumor *PTEN* (10q22-23) são responsáveis por um grupo de condições fenotipicamente diversificadas, que têm sido chamadas coletivamente de síndrome do tumor-hamartoma *PTEN*. Estas são raras condições autossômicas dominantes e incluem um subtipo de indivíduos com o fenótipo da Síndrome de Peutz-Jeghers (Rosito *et al*, 2005; Kopacova *et al*, 2009).

Os pólipos associados a Síndrome de Peutz-Jeghers podem ser diferenciados de pólipos hamartomatosos esporádicos e dos pólipos hamartomatosos associados a outras síndromes, devido a um núcleo de músculo liso que arboriza todo o pólipo. Pacientes com a síndrome de Peutz-Jeghers, possuem um risco aumentado de desenvolver tumores gastrointestinais malignos, especialmente câncer colorretal e o câncer de intestino delgado. Eles também apresentam um risco aumentado para outros tumores, como o câncer de mama, útero, ovário, pâncreas, pulmão e testículo (Witzfeld *et al.*, 2001; Kopacova *et al.*, 2009).

## **7. POLIPOSE ADENOMATOSA FAMILIAR (PAF)**

A mais comum dentre as síndromes hereditárias de predisposição ao câncer associadas a polipose intestinal é a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), que tem herança autossômica dominante e é causada por mutação germinativa no gene supressor de tumor *APC* (adenomatous polyposis coli). Cerca de 1% dos casos de câncer colorretal estão associados a mutações germinativas em *APC* (Galiatsatos & Foulkes, 2006; Shulmann *et al.*, 2007) e a incidência da FAP é estimada em 1 em cada 10.000 nascidos vivos e a prevalência é de cerca de 1 em 24.000 (Church, 2009).

### **7.1. Aspectos Gerais**

A principal característica da PAF é o desenvolvimento de centenas a milhares de pólipos adenomatosos no cólon e reto, usualmente na adolescência com uma progressão quase inevitável para o câncer colorretal (CCR) em torno dos 35-40 anos, idade

significativamente mais jovem do que a idade de diagnóstico observada para o CCR esporádico (Varesco, 2004).

Embora o desenvolvimento do câncer colorretal se destaque como a complicação mais frequente, FAP é uma doença de crescimento multissistêmico (Groen. *et al.*, 2008).

Além do desenvolvimento no cólon e reto, adenomas duodenais também são comuns, embora o desenvolvimento do câncer neste local seja menos comum, bem como a manifestação de outras formas extracolônicas (Bülow *et al.*, 2006; Emma. *et al.*, 2009).

Mutações no gene *APC*, localizado no cromossomo 5, são encontradas em 80 – 85% dos casos e nesses casos geralmente o fenótipo é da forma clássica da doença (PAF clássica) caracterizada pela presença de mais de 100 pólipos colônicos. Uma forma variante da síndrome, a Polipose Adenomatosa Familiar Atenuada (PAFA), está associada à presença de um número menor de pólipos colônicos (por definição, menos de 100), e nestas famílias mutações germinativas de *APC* são encontradas em cerca de 10% dos casos apenas (Bouguen *et al.*, 2007) (Galiatsatos & Foulkes, 2006; Shulmann *et al.*, 2007).

## **7.2 Aspectos Clínicos**

Os sintomas são incomuns em crianças e adolescentes, até que os adenomas sejam grandes e numerosos, de modo a causar sangramento retal ou mesmo anemia. Outros sintomas não específicos como alterações no hábito intestinal, constipação ou diarreia, dor abdominal ou massa abdominal palpável e perda de peso em pacientes jovens podem levar a realização de exames do retossigmóide e conseqüentemente à identificação de pólipos, sugerindo o diagnóstico de PAF (Half *et al.*, 2009; Church *et al.*, 2009).

### **7.2.1 Manifestações colônicas**

A apresentação clínica da PAF pode ser muito variável, com diagnóstico em idade mais avançada em pacientes apresentando poucas dezenas de pólipos adenomatosos até o diagnóstico em pacientes jovens com milhares de pólipos adenomatosos por todo o cólon e/ou reto. (Lipton e Tomlinson, 2006). A maioria dos pólipos de característica benigna se desenvolvem ainda na adolescência, mais comumente no cólon distal (retossigmóide) como pequenos nódulos intramucosos (Half. *et al.* 2009).



## **7.2.2 Outras manifestações Gastrointestinais e Extracolônicas**

Indivíduos com PAF podem também desenvolver uma série de manifestações extracolônicas. Pólipos glandulares fúndicos no estômago estão presentes em 90% dos pacientes PAF, entretanto, raramente evoluem para câncer (Bianchi *et al.*, 2008). Cerca de 20-100% dos pacientes com PAF apresentam pólipos adenomatosos em duodeno, preferencialmente na segunda ou terceira porção do duodeno e especialmente na região periampular. Cerca de 5% progredirão para adenocarcinoma de duodeno (Gallagher *et al.*, 2006)

Outra manifestação extracolônica presente em cerca de 70-80% dos pacientes com PAF, que pode ser usada como um importante marcador clínico, é a Hipertrofia Congênita do Epitélio Pigmentar da Retina (HCEPR) que pode ser detectada desde o nascimento através de fundoscopia realizada por um oftalmologista experiente (Nieuwenhuis e Vasen, 2007). Cistos epidermóides presentes principalmente em face e couro cabeludo também são encontrados frequentemente em pacientes com PAF, assim como osteomas (Tumores ósseos) na mandíbula e calota craniana predominantemente, alterações dentárias, adenomas de glândula adrenal e tumores desmóides (Stuart e Clark, 2006; Lipton e Tomlinson, 2006; Lindor e Greene, 1998; Half *et al.*, 2010).

## **8. SÍNDROME DE LYNCH**

A maioria dos CCR hereditários estão associados ao diagnóstico de Síndrome de Lynch. A etiologia do CCR nestes casos é devida a uma combinação de fatores genéticos e ambientais, mas os fatores genéticos têm um papel dominante (Abdel-Rahman *et al.*, 2008; Vasen, 2005).

### **8.1 Aspectos Gerais da Síndrome**

A síndrome de Lynch, também conhecida como Câncer Colorretal Hereditário Não Polipomatoso (HNPCC, do inglês Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer), se caracteriza pelo desenvolvimento de CCR, câncer de endométrio e vários outros tumores em pacientes com idade jovem (por volta dos 45 anos de idade). Trata-se de uma doença com padrão de herança autossômica dominante, na qual é possível identificar indivíduos afetados por câncer (principalmente CCR) em mais da metade dos membros da família nas

sucessivas gerações.(Vasen, 2005; Lagerstedt Robinson *et al.*, 2007; Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Abdel-Rahman *et al.*, 2008).

A síndrome de Lynch é causada por mutações germinativas em um dos principais genes do sistema MMR (mismatch repair) de reparo do DNA (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), com uma penetrância de aproximadamente 80% para CCR, 60% para câncer de endométrio e até 20% para os outros tipos de tumores. Alterações genéticas nestes genes causam instabilidade genômica em seqüências curtas repetidas do genoma (chamadas microssatélites) e o efeito cumulativo destas alterações em genes relacionados ao controle do ciclo celular levam ao desenvolvimento do tumor (Vasen, 2005; Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Hadley *et al.*, 2008; Shia, 2008; Baudhuin *et al.*, 2005; Watson *et al.*, 2005; Nagorni, 2002; Abdel-Rahman *et al.*, 2008; Balaguer *et al.*, 2007).

## **8.2. Descrição Clínica da Síndrome de Lynch**

### **8.2.1. Espectro de Tumores**

Um amplo espectro de tumores é encontrado na síndrome de Lynch. Na primeira família descrita por Warthin no início do século 20 (1913), o câncer gástrico e o câncer de endométrio foram os tipos tumorais mais comuns; porém, nas seguintes gerações da mesma família descritas por Lynch em 1971, o CCR foi o tipo de tumor mais freqüente. A variação no padrão de tipos de câncer ao longo dos anos reflete na incidência de câncer na população através de certo período de tempo, e esta variação é distinta entre as famílias com síndrome de Lynch nas diferentes populações. Estas observações sugerem que, mesmo na síndrome de Lynch, os fatores ambientais têm um papel importante no processo carcinogênico (Vasen, 2005).

Além do alto risco de desenvolver CCR, os indivíduos afetados podem desenvolver outros tipos de tumores extracolônicos, como câncer de endométrio, ovário, estômago, trato urinário, pâncreas, intestino delgado, trato hepatobiliar e/ou cérebro. Outra das características da síndrome de Lynch é a ocorrência de múltiplos tumores nos pacientes afetados (Vasen, 2005; Arnold *et al.*, 2005; de la Chapelle, 2004; Balaguer *et al.*, 2007; Lagerstedt Robinson *et al.*, 2007; Watson *et al.*, 2005; Abdel-Rahman *et al.*, 2008; Hadley *et al.*, 2008).

### **8.2.2. Câncer Colorretal (CCR)**

Pacientes com mutações em genes MMR desenvolvem adenomas colônicos mais freqüentemente que pacientes sem este tipo de alterações. Estes adenomas são maiores e uma grande proporção deles mostra características histológicas sugestivas de degeneração maligna tais como alto grau de displasia e presença de arquitetura vilosa extensa. Os adenomas e carcinomas nos pacientes com síndrome de Lynch estão predominantemente localizados no cólon proximal. Além da sua localização, os tumores do espectro Lynch apresentam características patológicas específicas, como infiltrado linfocitário, caráter mucinoso e pouca diferenciação histo-citológica. Na síndrome de Lynch, a seqüência adenoma-carcinoma ocorre mais rapidamente que nos casos de CCR esporádico. Em média, os pacientes afetados desenvolvem adenomas com 43 anos de idade, e o diagnóstico do carcinoma ocorre aos 46 anos de idade. Estas observações, em combinação com a proporção relativamente alta de pacientes com desenvolvimento de CCR em três anos logo após a realização de uma colonoscopia sem alterações, sugerem que a seqüência adenoma-carcinoma estaria acelerada e que a progressão do adenoma ao carcinoma levaria menos de 3 anos, comparado com CCR esporádico, no qual este processo poderia levar de 10 a 15 anos (Vasen, 2005; Arnold *et al.*, 2005; Abdel-Rahman *et al.*, 2008).

### **8.3. Estimativas de Risco**

Nos pacientes com diagnóstico de síndrome de Lynch, o risco de desenvolver câncer ao longo da vida é dependente do sexo e do gene afetado. O risco de desenvolver CCR em pacientes com mutação em genes MMR varia de 30-85%, o risco de desenvolver câncer de endométrio varia de 30-60%, e o risco de desenvolver outros tipos de tumores do espectro Lynch é menor que 10% (Vasen, 2005; Lu *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2005).

### **8.4. Critérios Clínicos para diagnóstico da Síndrome de Lynch**

Nos primeiros estudos sobre a síndrome de Lynch que tiveram como objetivo a definição das características clínicas da síndrome, o Grupo Internacional Colaborativo de HNPCC, atualmente chamado Sociedade Internacional de Tumores Gastrointestinais Hereditários (InSiGHT, International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumors) propôs

uma serie de critérios clínicos para a síndrome de Lynch em 1990 que foram modificados em 1999 (Anexos 1 e 2).

Os critérios de Amsterdam modificados reconheceram a importância dos tumores extracolônicos para o diagnóstico da síndrome. Porém, esses critérios poderiam ser pouco sensíveis em casos onde a família é pequena ou a história familiar não é conhecida. Para o auxílio no diagnóstico de casos como estes, portanto, foram propostas os Critérios de Bethesda, em 1996 (Boland *et al.*, 1998). Estes critérios descrevem praticamente todas as condições clínicas suspeitas da síndrome de Lynch (Anexo1 e 2). Em dezembro de 2002, o Instituto Nacional de Câncer (NCI, National Cancer Institute, USA) realizou um workshop sobre estes critérios Bethesda propondo uma atualização (Vasen, 2005; Umar *et al.*, 2004).

## **8.5. Aspectos Moleculares**

### **8.5.1. Sistema MMR de Reparo do DNA**

A síndrome de Lynch é causada por mutações germinativas em qualquer um dos genes do sistema MMR de reparo do DNA. A função principal do sistema MMR é manter a estabilidade genômica corrigindo erros de pareamento gerados durante a replicação do DNA (Peltomäki, 2005; Abdel-Rahman *et al.*, 2008). Dentre as nove proteínas humanas identificadas, mutações em três delas (produtos dos genes hMLH1, hMSH2, hMSH6) são responsáveis por mais do 95% das mutações associadas à síndrome de Lynch. Esses genes também estão envolvidos na apoptose induzida por sinalização em resposta ao dano, e sua inativação não só acrescenta a ocorrência de mutações, mas também confere vantagens no crescimento seletivo das células, resultando na formação do tumor (Peltomäki, 2005).

O sistema MMR de reparo é formado por dois complexos moleculares: o complexo MutS (msh2/msh6) e o complexo MutL (mlh1/pms2). Ambos complexos protéicos atuam no reconhecimento e no reparo de erros de pareamento incorreto entre as duas fitas do DNA e loops de inserções e/ou deleções que podem se formar durante o processo de replicação (Peltomäki, 2005; O'Brien *et al.*, 2006).

### **8.5.2. Sistema MMR e Instabilidade Genômica**

Uma falha ou deficiência no sistema MMR de reparo leva a substituição de bases na seqüência de DNA ou pode causar inserções ou deleções em seqüências curtas repetidas do genoma chamadas microssatélites, ocasionando a uma perda ou ganho de unidades de repetição nestas regiões. Este fenômeno de alteração no número de repetições nessas regiões específicas do genoma, é chamado de instabilidade de microssatélites (IMS) (Abdel-Rahman *et al.*, 2008)

### **8.6. Diagnóstico Molecular**

Ao longo destes últimos anos, técnicas de rastreamento de mutações nos genes MMR têm sido otimizadas. Dentre as técnicas de rastreamento utilizadas para diagnóstico da síndrome de Lynch, a análise de Instabilidade de Microssatélite (IMS) e a Imunohistoquímica (IHQ) das principais proteínas MMR, são as recomendadas e são as mais utilizadas. Uma vez identificada IMS ou ausência de expressão de uma das proteínas do sistema MMR por IHQ, se procede à busca por mutações germinativas nos genes associados à doença. Esta investigação geralmente é realizada por seqüenciamento direto de toda a sequência codificadora dos genes MMR mais comumente afetados. A IHQ pode auxiliar muito na identificação do gene que mais provavelmente está mutado. Os genes mais comumente afetados por mutações na síndrome são MLH1, MSH2 e MSH6. Porém, em pacientes sem mutação de ponto identificada nestes genes), a presença de mutações mais raras em PMS2 ou rearranjos gênicos pode explicar a causa da síndrome. Nestes casos, a técnica de MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) pode auxiliar no rastreamento dos rearranjos (Abdel-Rahman *et al.*, 2008).

## **9. GENE *MUTYH* E SÍNDROME DA POLIPOSE ASSOCIADA AO GENE *MUTYH*.**

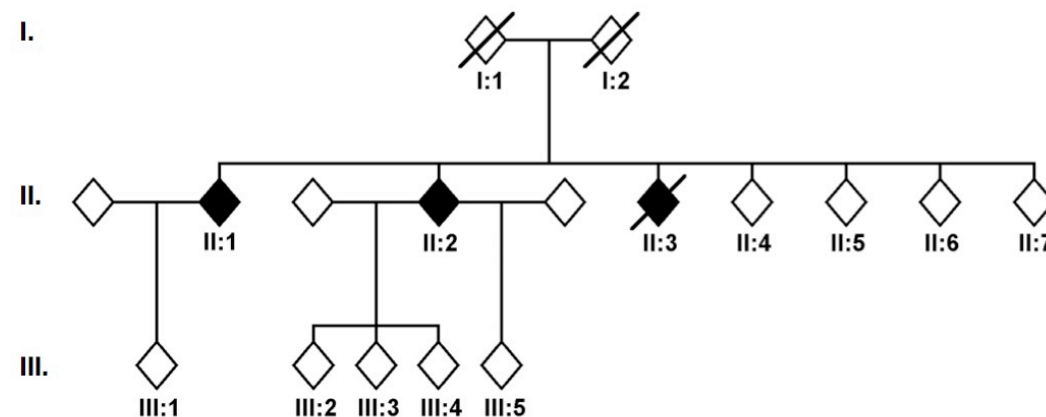
Em 2002 uma nova síndrome autossômica recessiva de oligopolipose colônica foi descrita na literatura por Al Tassan *et al.*, após estudo de uma família Britânica denominada como família "N" e submetida a análises envolvendo o gene homólogo de MutY (MYH ou *MUTYH*) (Slupska *et al.*, 1996). Em 2003, artigos publicados por Sampson e Cheadle referiram pela primeira vez os achados a existência de uma nova síndrome de Polipose colônica associada ao gene *MUTYH* (PAM).

### 9.1 Família “N”

A família britânica denominada de família “N”, tivera três gerações avaliadas por Al-Tassan (Figura 2) na qual dois irmãos da segunda geração apresentavam quadro de polipose colônica, com aproximadamente 50 pólipos adenomatosos e um terceiro irmão havia falecido por adenocarcinoma de cólon com identificação de adenomas sincrônicos.

A análise molecular dos adenomas, realizada através de sequenciamento completo do gene *APC*, revelou a presença de 18 mutações somáticas no gene, sendo 15 destas, transversões G:C-T:A, encontradas normalmente em tumores esporádicos descartando a possibilidade de mutações herdadas em *APC*. Os principais agentes causadores deste tipo de transversão são espécies reativas de oxigênio (ROS - Reactive Oxygen Species), produzidas pelo metabolismo aeróbio. As enzimas responsáveis pelo reparo e prevenção deste tipo de lesão fazem parte do sistema de reparo por excisão de base (BER - do inglês - Base Excision Repair). Foram realizadas análises moleculares dos genes deste complexo e constatada a presença de duas mutações, G382D e Y165C, no gene *MUTYH*.

Figura 2: Família N



Adaptado de Al-Tassan, *Nature Genetics* 2002.

## 9.2 Sistema de Reparo por Excisão de Bases (BER)

O mecanismo responsável pela correção e prevenção das transversões ocasionadas por ROS é o sistema de reparo por excisão de base (BER - do inglês Base Excision Repair). Este sistema foi caracterizado primeiramente em *E. Coli* e as principais enzimas envolvidas são identificadas como MutT, MutM e MutY. Em 1996, Slupska e colaboradores reportaram as enzimas homólogas em humanos MTH1, OGG1 e MUTYH (hMYH) respectivamente.

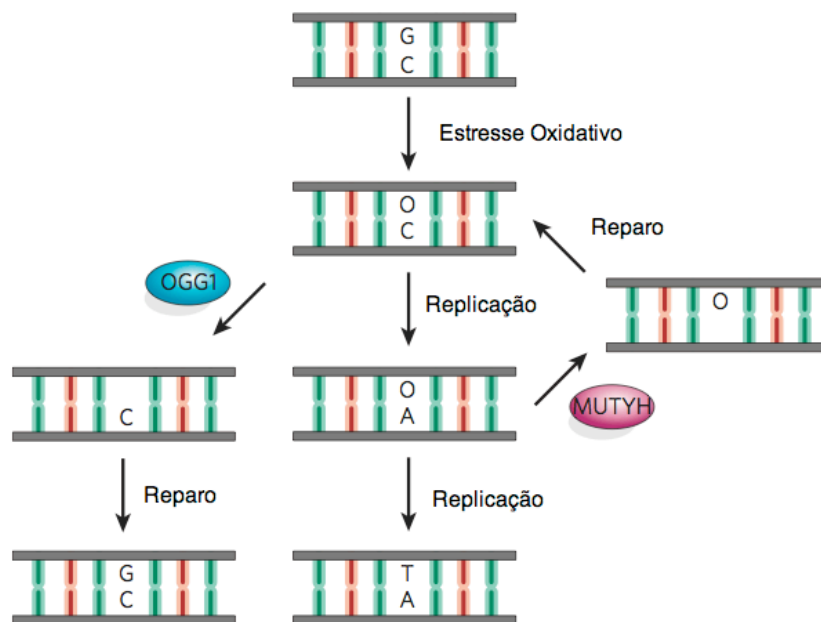
A via de reparo BER é coordenada por uma série de eventos enzimáticos, os quais podem ser divididos globalmente em duas etapas. A primeira etapa se caracteriza pelo reconhecimento e a excisão, retirada, de uma base danificada por uma série de DNA-glicosilases específicas. A próxima etapa do processo envolve uma série de ações sequenciais de diferentes enzimas para a correção do DNA, inserindo um ou alguns nucleotídeos direcionado pela fita molde, a partir do sítio danificado (Kairupan and Scott., 2007).

A via BER é geralmente iniciada por DNA glicosilases dano-específicas, que reconhecem as lesões e retiram as bases danificadas do DNA, através de clivagem da ligação N-glicosídica entre a 2'-desoxirribose e a base danificada. As DNA-glicosilases podem ser classificadas de acordo com seu mecanismo de ação em mono ou bi-funcionais. Esta característica é que determina qual sub-via de BER será utilizada, pois o sistema BER possui duas diferentes sub-vias de reparo, conhecidas como via de reparo de curta ou longa duração (Fortini *et al.*, 1999).

A primeira etapa é caracterizada pela ação de uma DNA-glicosilase que reconhece a base específica danificada, cliva a ligação N-glicosídica dando origem a um sítio apurínico / apirimídico (AP). Esta "lesão" é, posteriormente feita por uma AP-endonuclease ou uma AP-liase para gerar uma quebra de fita simples (SSB - Single strand break). Após a clivagem da ligação fosfodiéster, o mecanismo de BER pode prosseguir através de uma das duas diferentes sub-vias: a via BER de curta duração e a via BER de longa duração. Elas são diferenciadas pelo tamanho da abertura feita na fita de DNA pelas enzimas de reparo envolvidas em cada processo. A primeira sub-via é caracterizada pela ressíntese de um único nucleotídeo, pela DNA polimerase  $\beta$  (Pol  $\beta$ ), no local da lesão. A via longa de BER, envolve a ressíntese de vários oligonucleotídeos próximos a lesão, que pode ser de dois a sete nucleotídeos de extensão, que pode ser realizada pelas Pol  $\beta$  ou ambas as polimerases replicativas, Pol  $\delta$ , ou  $\epsilon$ . O deslocamento do eixo da lesão contendo a lesão exige a ação de agentes adicionais, ou seja, uma flap-endonuclease, FEN1, que reconhece e cliva a o fragmento na base da estrutura e PCNA age formando um grampo para a ação das polimerases replicativas (Fortini *et al.*, 2003).

Dentre as funções do sistema BER está o reparo de mutações causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) e danos resultantes da metilação do DNA, desaminação e hidroxilação. Espécies reativas de oxigênio são produzidas na cadeia respiratória e em resposta a componentes inflamatórios. Estes também podem ser produzidos como consequência de radiação ionizante ou exposição ambiental a metais de transição, oxidantes químicos e radicais livres (David *et al.*, 2007; Loon *et al.*, 2010). A 8-oxo-7,8-dihidro-2'-dioxiguanosina (8-oxoG) é o produto mais estável, gerado por ROS, capaz de causar danos oxidativos no DNA. Estas bases quando livres são incorporadas ao DNA pelas próprias polimerases e a não remoção da 8-oxoG antes da replicação, resulta erroneamente no pareamento desta com uma adenina, provocando a transversão de bases (G:C-T:A) (Neeley e Essigmann, 2006)

**Figura 3: Reparo Por Excisão de Base (BER)**



Adaptado de David SS *et al.*, Nature 2007.



### 9.2.1 Enzimas MTH1 e OGG1

A enzima MTH1(hMutT) é a responsável por prevenir, através da hidrólise da 8-oxo-dGTP livre, a incorporação da 8-oxoG no DNA pelas polimerases. O outro componente do sistema BER, a glicosilase OGG1 (hMutM), é encarregada de reconhecer e remover a 8-oxoG quando pareada erroneamente a uma Citosina(C) durante a replicação do DNA, para que em seguida outras enzimas da via BER possam restaurar a fita de DNA com a base excisada. No entanto, caso isto não ocorra, e a 8-oxoG não seja retirada, na replicação seguinte será pareada de forma incorreta com uma adenina, formando um sítio A:8-oxoG e posteriormente A:T, ocasionando uma transversão (Paz-Elizur *et al.*, 2008; David *et al.*, 2007).

### 9.2.1 Gene MUTYH - hMYH - hMutY

A enzima MUTYH-glicosilase é codificada pelo gene MUTYH (OMIM# 604933), localizado no braço curto do cromossomo 1 (1p32.1-p34.3). O gene consiste em 16 exons que codificam uma proteína de 546 aminoácidos (NCBI# NP\_036354.1), responsável pela remoção de resíduos de adenina pareados erroneamente com a 8-oxoG na fita de DNA recém sintetizada durante a replicação. Este processo gera sítios apurínicos / apirimídicos (AP), que são reparados por DNA polimerases (Loon *et al.*, 2010).

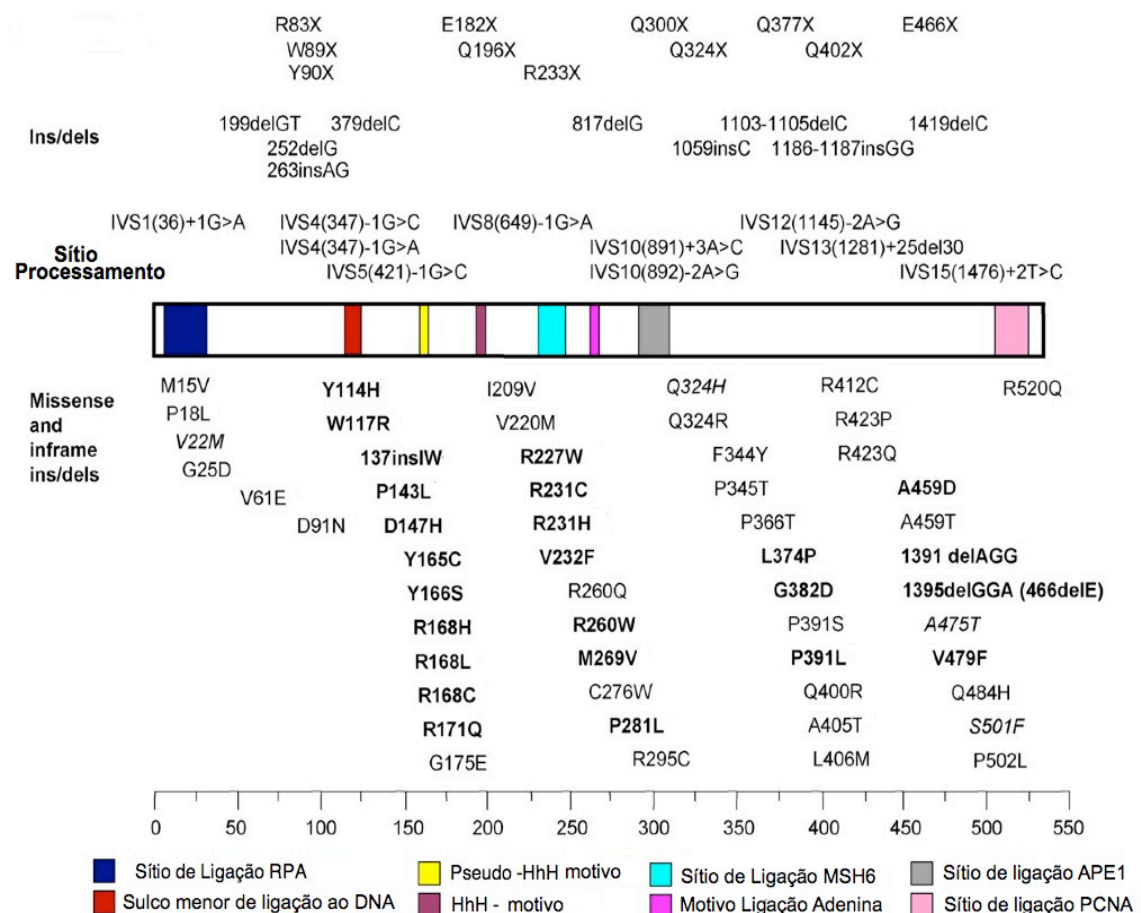
A proteína MUTYH, apresenta uma extensão no domínio N-terminal que está envolvida na segmentação mitocondrial de MUTYH e na interação com a proteína de replicação A (RP-A), enquanto no domínio C-terminal da proteína, se encontra a sequência de localização nuclear e o motivo de interação com PCNA. A proteína MUTYH possui localização tanto nuclear quanto mitocondrial, o que é direcionado por uma sequência contida nos 14 últimos aminoácidos da porção amino-terminal da proteína (Ohtsubo *et al.*, 2000). Algumas das variantes mais bem caracterizadas do gene codificam proteínas de 52, 53 e 57 kDa . A forma de 57kDa é encontrada na mitocôndria e localizada na matriz mitocondrial (Takao *et al.*, 1998; Parker *et al.*, 2000).

A proteína contém vários domínios funcionais, incluindo: domínio N-terminal na região 5', que contém uma região catalítica que inclui uma helix-hairpin-helix (HhH), uma pseudo HhH e um conjunto de motivos de alças de ferro-enxofre, que também são motivos comuns em outras glicosilases do sistema BER. O domínio C-terminal da região 3', é parte da região que faz homologia com a enzima MTH1 e desempenha um papel importante no reconhecimento da 8 oxoG. A proteína MUTYH, também apresenta domínios de ligação ao

DNA, um motivo de ligação da adenina e diversos domínios de interação com APE1, com a enzima PCNA, RPA e MSH6, localizado em diferentes regiões do gene (Figura 4) (Cheadle e Sampson, 2007)

As duas mutações mais comuns em MUTYH, p.Y179C e p.G396D, estão situadas no domínio catalítico e no domínio C-terminal, respectivamente. Ambos resíduos possuem um importante papel no reconhecimento da 8-oxoG quando pareada erroneamente com uma adenina, 8-oxoG:A. (Volk *et al.*, 2000; Lu *et al.*, 2006; David *et al.*, 2007). Em um estudo funcional, as variantes p.Y179C e p.G396D, chegaram a apresentar uma redução de 98% e 86%, respectivamente, na atividade de remoção da adenina pareada erroneamente, comparada ao tipo selvagem (Al-Tassan *et al.*, 2002).

Figura 4. Espectro de Mutações de acordo com os domínios proteicos de MUTYH

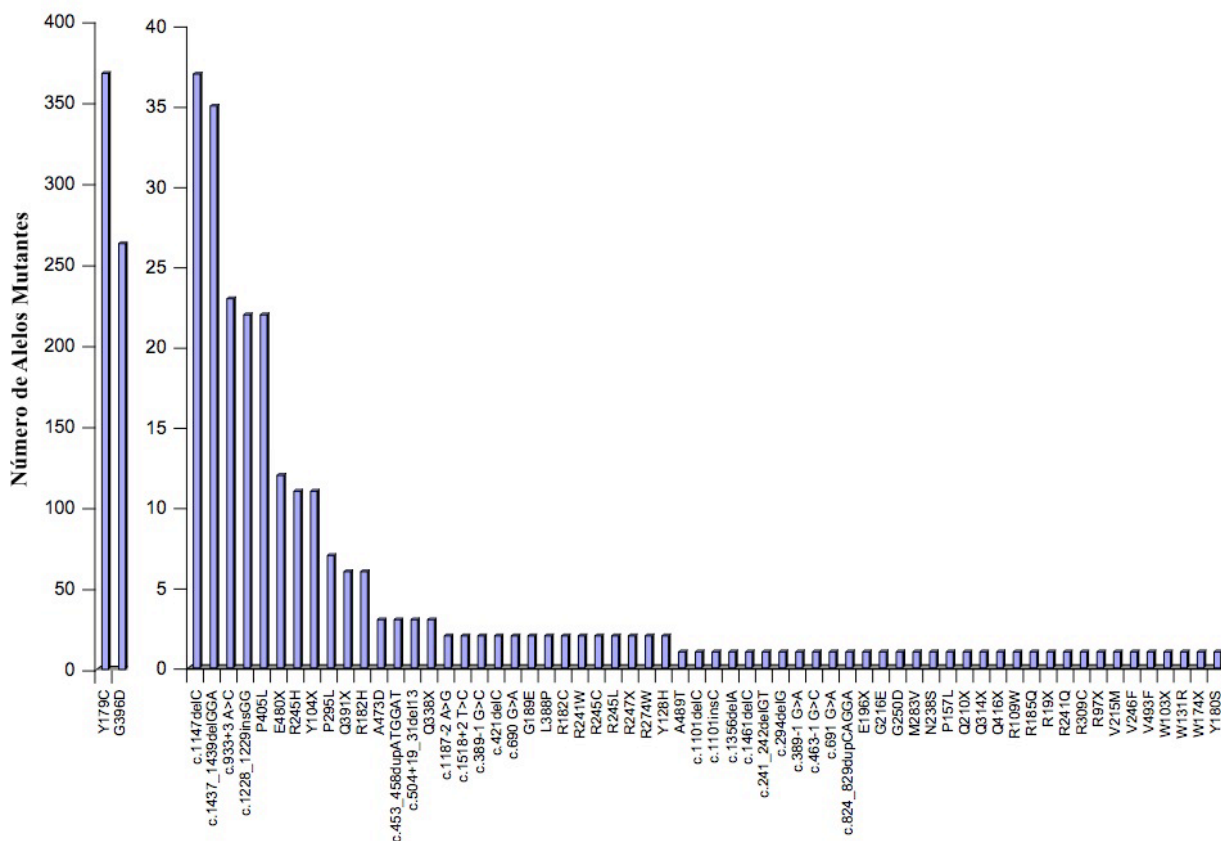


Adaptado de Cheadle e Sampson, 2007

### 9.2.2.1 Mutações em MUTYH

Diversos tipos de mutações pontuais foram descritos no gene MUTYH, incluindo mutações de troca de sentido, sítio de splicing e mutações de perda de sentido, entretanto, ainda não há relatos de grandes deleções ou duplicações genômicas. O gene possui dois hotspots, localizados nos exons 7 e 13, referentes à localização das duas mutações comuns p.Y179C e p.G396D, respectivamente, que juntas correspondem a aproximadamente 80% dos alelos mutantes reportados em populações européias e norte-americanas (Figura 5). Entretanto, não há relatos de mutações em MUTYH em coreanos, japoneses ou judeus de origem européia (Enholm *et al.*, 2003; Sampson *et al.*, 2003; Vandrovcova *et al.*, 2004; Isidro *et al.*, 2004; Gismondi *et al.*, 2004; Aceto *et al.*, 2005; Miyaki *et al.*, 2005; Kairupan *et al.*, 2005; Nielsen *et al.*, 2010).

**Figura 5: Frequência das mutações de MUTYH relatadas em pacientes PAM com mutações.**



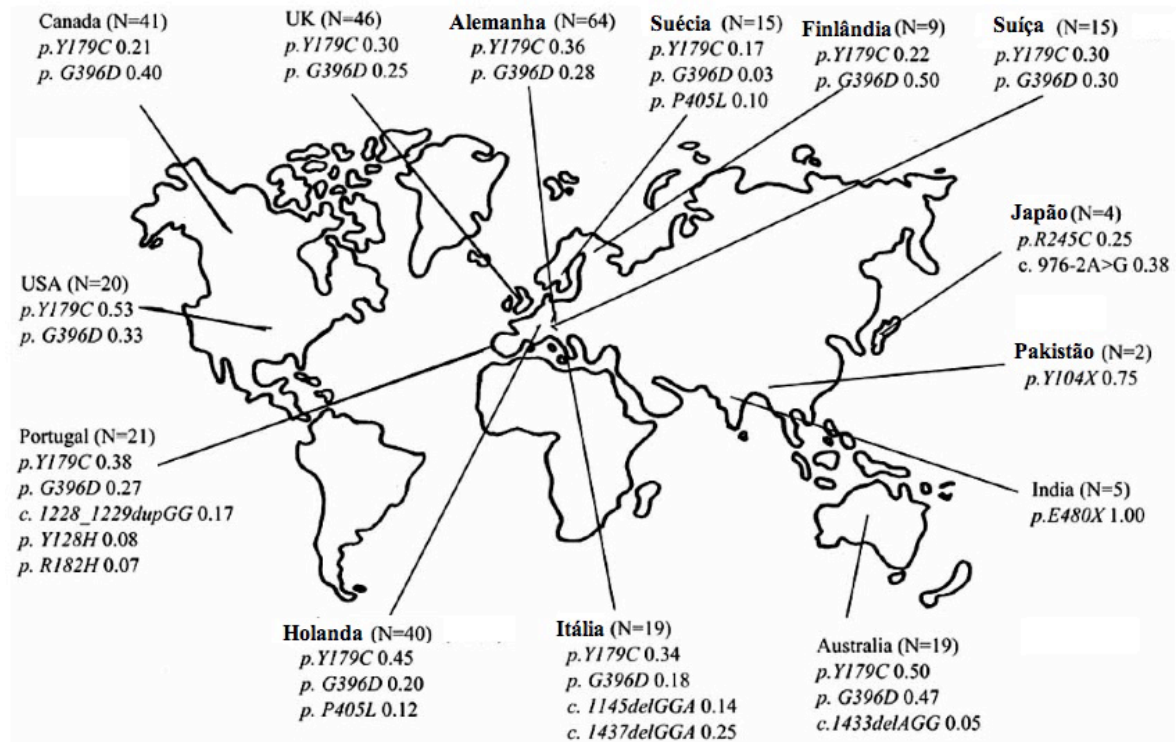
Adaptado de Sampson & Jones 2009

Até 2008, mais de 60 diferentes mutações do gene MUTYH, haviam sido relatadas em uma variedade de combinações bialélicas em pacientes com o fenótipo de PAM (Fig. 5). Estas são distribuídas ao longo de todo o gene, com exceção das regiões 3' e 5' terminais. Elas incluem mutações de troca de sentido (~47%), mutações sem sentido (~20%), pequenas inserções ou deleções (~14%), alterações em sítios de processamento (~14%), e inserções ou deleções in-frame (<5%) (Sampson & Jones, 2009).

Conforme recomendado pelo Human Genome Variation Society (HGVS) em colaboração com The National Center of Biotechnology (NCBI), o maior transcrito existente de MUTYH (NM\_001128425.1), ([www.lovd.nl/mutyh](http://www.lovd.nl/mutyh)), deve ser utilizado como referência. Isto fez com que a nomenclatura das mutações até então descritas se modificasse. Este difere do utilizado anteriormente pela inserção de 42 nucleotídeos após o c.157. Com a nova nomenclatura, as duas mutações comuns descritas como p.Y165C e p.G382D, passaram a ser descritas como p.Y179C e p.G396D, respectivamente.

Diversas mutações população-específicas já foram descritas no gene MUTYH, dentre as mutações descritas estão: c.1437\_1439del em italianos (p.Glu480del), c.1227\_1228dup em espanhóis e portugueses, p.P405L em Holandeses, p.E480X em Indianos britânicos, p.A437D em finlandeses, p.Y104X em paquistaneses, p.Rd45C, IVS10-2A>G (sítio de processamento) e p.A359V em japoneses (Isidro, 2004; Gismond, 2004; Nielsen, 2005; Aceto 2005; Venesio, 2004; Miyaki, 2005; Dolwani, 2007; Kim, 2007a; Kim, 2007b; Yanaru-Fujisawa, 2008; Gomez-Fernandez, 2009).

**Figura 6. Frequência alélica de mutações germinativas em portadores bialélicos (Mutações comuns e população-específica)**



Adaptado de Poulsen e Bisgaard 2008.

### 9.3 Síndrome da Polipose Associada ao gene MUTYH (PAM)

#### 9.3.1 Considerações gerais

Em um artigo de revisão publicado recentemente, Nielsen e colaboradores apresentaram relatos de mais de 500 pacientes com PAM. A maioria dos portadores de mutações bialélicas, apresentam entre 10 e algumas centenas de pólipos, dentre estes apenas dois casos apresentavam mais de 500 pólipos. Também um grande número de pacientes apresentou o desenvolvimento de tumor colorretal na ausência de pólipos colorretais. Em torno de 60% dos pacientes PAM com polipose apresentam CCR ao primeiro diagnóstico, com uma idade média de 48 anos. Em um estudo de coorte para CCR, a penetrância do CCR em pacientes PAM foi estimada em 19% até os 50 anos e de 43% até os 60 anos de idade (Lubbe, 2009).

### 9.3.2 Manifestações Colônicas

Mutações bialélicas são encontradas em 28% dos pacientes que apresentam entre 10-100 pólipos e 14% dos pacientes com 100-1000 pólipos, sem mutações germinativas em APC (APC-negativos). Um estudo caso-controle realizado por Balaguer e colaboradores em 2007, mostrou que o fenótipo de mais de 15 adenomas sincrônicos e o desenvolvimento de CCR em idade jovem (antes dos 50 anos), tem sensibilidade de 75% e especificidade de 93.8% para detecção de mutações bialélicas em MUTYH.

O amplo espectro fenotípico de manifestações colônicas no qual se sobrepõe os critérios clínicos de síndromes polipóides como a PAF e PAFA, dificulta o diagnóstico clínico das famílias com a síndrome PAM. Nestes casos mutações em MUTYH são encontradas em 15–30% de todos os pacientes PAFA e em torno de 7-22% de pacientes PAF (Sieber *et al.*, 2003; Aretz *et al.*, 2006; Aceto *et al.*, 2005; Al-Tassan *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2002; )

### 9.3.3 Correlação Genótipo/Fenótipo

Diversos estudos funcionais com as variantes de MUTYH já foram publicados, entretanto os resultados ainda são controversos. Estudos com as duas mutações comuns p.Y179C e p.G396D, mostrou que a variante p.Y179 que está localizada no sítio HhH da proteína, tem um importante papel no reconhecimento da 8oxoG pareada com a adenina e na estabilidade do complexo DNA-Proteína. Com relação a variante p.G396, esta se localiza no domínio C-terminal da proteína e também está envolvida no reconhecimento do pareamento errôneo 8oxoG-Adenina e na flexibilidade conformacional da proteína (Guan, 1998; Fromme, 2004; Chmiel, 2001; D'Agostino 2010).

Alguns estudos também demonstraram que MUTYH-p.Y179C apresenta uma grande redução da atividade enzimática quando comparada a de MUTYH-p.G396D. Foi demonstrado recentemente que o fenótipo de portadores de mutações bialélicas p.G396D é menos grave do que pacientes homocigotos p.Y179C (Nielsen, 2009). A média de idade ao diagnóstico de CCR em pacientes homocigotos p.G396D é de 58 anos, 52 anos para heterocigotos compostos p.G396D/p.Y179C e 46 anos em pacientes homocigotos p.Y179C (Lubbe, 2009; Nielsen 2010).

#### 9.3.3.1 Heterocigotos

O risco de CCR em portadores heterozigotos de mutações germinativas do gene MUTYH tem sido alvo de muitos debates, pois nestes casos o CCR se desenvolveria, possivelmente, numa idade mais avançada tornando o risco equivalente ao da população em geral. A taxa de portadores de mutações monoalélicas em MUTYH nos grupos controles (Ontario, Canada; Melbourne, Australia; Seattle, WA, USA e Reino Unido) é de 1,5-2,0% para todas as mutações, mais especificamente, 1,1-1,6% para p.G396D, 0,4-0,6% para p.Y179C e menos de 0,1% para outras mutações (Cleary, 2009). O risco de desenvolver CCR nestes pacientes MUTYH-heterozigotos, seria a partir de um segundo evento somático em MUTYH, levando as células a possuir um sistema BER defeituoso que, conseqüentemente levaria a adquirir mais mutações somáticas em genes, como APC e KRAS. Essas mutações somáticas poderiam induzir a tumorigênese nestes casos (Halford *et al.*, 2003; Bougatef *et al.*, 2007; Lipton *et al.*, 2003)

Em 2010, Nielsen e colaboradores demonstraram em um artigo de revisão, que dos dezessete estudos caso-controle realizados até o presente momento, apenas três encontraram significância estatística para o risco de CCR neste grupo de pacientes. Entretanto alguns estudos demonstraram um discreto aumento no risco de CCR em parentes de primeiro grau, com mais de 55 anos, de portadores de mutações monoalélicas ou bialélicas em MUTYH (Lubbe *et al.*, 2009; Jones *et al.*, 2009; Jenkins *et al.*, 2006).

### **9.3.4 Características Histológicas e Moleculares apresentadas na síndrome PAM**

Dentro do quadro de polipose colônica, pacientes com PAM podem apresentar uma variabilidade na morfologia dos pólipos presentes no intestino. Os tipos de pólipos reportados em pacientes PAM, são principalmente adenomas tubulares, adenomas tubulovilosos, adenomas serrilhados, hiperplásicos e polipose mista com histologia hiperplásica e adenomatosa. Alguns estudos demonstraram que em 47% dos pacientes PAM, são encontrados um ou mais pólipos hiperplásicos e/ou adenomas sésseis serrilhados (Lipton *et al.*, 2003; Gismond *et al.* 2004; Sampson *et al.* 2003; Sieber *et al.* 2003; Ponti *et al.*, 2005; Chow, *et al.* 2006; Boparai *et al.*, 2008; O'Shea *et al.*, 2008). Em estudo realizado por Casper em 2009, a maioria dos pólipos foram encontrados no cólon ascendente e ceco (29 e 78,4%, respectivamente), 5,4% foram localizados a partir da flexura esplênica e 16,2% no cólon transverso.

A característica molecular dos carcinomas e adenomas colorretais associados a PAM, está relacionada a notável preponderância de mutações somáticas do tipo transições de G para T. Aliás, este foi o padrão de mutações adquiridas no gene APC em

tumores da família “N”, descrita anteriormente, que levou ao reconhecimento de PAM como uma síndrome distinta (Sampson & Jones, 2009).

Em alguns estudos, mutações somáticas em *APC* foram encontradas em 14-83% dos tumores colorretais de pacientes PAM e aproximadamente 64% dos tumores dos pacientes PAM, apresentam uma mutação específica no códon 12 do gene *KRAS*. Mutações em *P53* e *SMAD4* também foram encontradas de forma menos frequente (Lipton *et al.*, 2003; Lefevre *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2009a).

#### **9.3.4.1 Instabilidade de Microssatélites (IMS)**

A via IMS não é uma via comum de desenvolvimento do tumor em pacientes com PAM, entretanto pequenos estudos encontraram uma frequência de alta-IMS em tumores de paciente PAM que variou de 0-18%, o que sugere ser uma via alternativa, através da inativação de *MLH1*, para o desenvolvimento de tumores em alguns pacientes da síndrome (Lefevre *et al.*, 2004; Colebatch *et al.*, 2006; Cleary *et al.*, 2009; Lubbe *et al.*, 2009; Nielsen *et al.* 2009a; O’Shea *et al.*, 2008).

Os tumores apresentados por pacientes PAM, apresentam características similares aos tumores com alta-IMS, encontrados na SL e em pacientes esporádicos, com uma preferência pelo cólon proximal, entretanto pacientes com PAM apresentaram uma elevada taxa do histotipo mucinoso e uma aumentada presença de infiltrados linfocitários (TIL’s - Tumor Infiltrating Lymphocytes) comparado aos tumores esporádicos (Nielsen *et al.*, 2010; Cleary *et al.*, 2009; Lipton *et al.*, 2003).

#### **9.3.5 Manifestações Extracolônicas**

A incidência de manifestações extracolônicas, como um todo, em pacientes PAM é quase o dobro comparado a população em geral e o risco de desenvolver estas manifestações chega a 38% ao longo da vida. A média de idade ao diagnóstico varia de 51 a 61 anos (Vogt, 2009).

Assim como nas síndromes PAF, PAFA e inclusive Síndrome de Lynch (SL) e variantes como a de Muir-Torre, pacientes com PAM apresentam uma variável quantidade de manifestações extracolônicas relatadas, como pólipos duodenais, pólipos gástricos de glândulas fúndicas, câncer de mama, tumores de pele, câncer de bexiga, adenomas de glândulas sebáceas, cistos epidermóides, epiteliomas, lipomas, hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (HCEPR), carcinoma de esôfago, pólipos e tumores em endométrio e ovário (Wasielewski *et al.*, 2010; Ajith Kumar *et al.*, 2008; Tricarico, *et al.*,



2009; Ponti. *et al*, 2007; South *et al.*, 2008; Nielsen M *et al.*, 2006; Bouguem G *et al.*, 2007; Jo W-S *et al.*, 2005; Jones *et al.*, 2007; Nielsen *et al.*, 2005; Kanter-Smoler *et al.*, 2006; Sieber *et al.*, 2003).

Estes tumores (adenomas, carcinomas e epitelomas), são constantemente encontrados na variante de Muir-Torre da síndrome de Lynch, já foram relatados em pacientes PAM, bem como hiperplasia de glândula sebácea, que não faz parte da síndrome de Muir-Torre também já foram relatados em pacientes PAM. Nestes casos foi encontrada uma mutação somática no gene BRAF, p.V600E (Guillen-Ponce *et al.*, 2010; Ponti *et al*, 2005; Ajith Kumar *et al.*, 2008).

Algumas manifestações encontradas frequentemente em pacientes com PAF, também foram relatadas em pacientes PAM, como lipomas, hipertrofia congênita do epitélio pigmentar da retina (HCEPR), osteomas, cistos epidermóides, tumor desmóide e pilomatricomas (Vogt *et al*, 2009; Gismondi *et al.*, 2004; Lefevre *et al.*, 2006; Avezzu *et al.*, 2008; de Ferro *et al.*, 2009; Baglioni, 2005).

A polipose duodenal ocorre em aproximadamente 17% dos portadores de PAM e o risco de câncer de duodeno chega a 5% ao longo da vida (Croitoru *et al.*, 2007; Stormorken *et al.*, 2006; Buecher, 2008).

Um estudo realizado por Vogt em 2009 reportou 17(11%) pacientes PAM com lesões gástricas e um alto risco de câncer gástrico, porém sem significância estatística. Entretanto um grupo de pesquisadores japoneses, em um estudo de 20 famílias com câncer gástrico, não encontrou nenhum portador bialélico das mutações comuns, porém os autores descreveram uma nova variante (IVS10-2A) em um sítio de processamento, presente em um grupo adicional de 148 casos consecutivos de câncer gástrico e que não foi encontrada no grupo controle (Tao, 2004; Vogt, 2009).

Não existe uma associação significativa com o câncer de endométrio, entretanto há relatos na literatura de tumores de endométrio entre pacientes PAM (Vogt *et al.*, 2009; Stormorken *et al.*, 2006; Tricarico *et al.*, 2009; Barnetson *et al.*, 2007; Ashton *et al.*, 2009).

A associação entre o câncer de mama e o gene MUTYH é possível devido à relação dos genes BRCA1 e BRCA2 no processo de reparo da 8oxoG (Le Page *et al.*, 2000). Em um estudo de coorte europeu, a incidência de câncer de mama em pacientes PAM foi significativamente maior. Entretanto, em contraste com os tumores que ocorrem na síndrome de câncer de mama e ovário hereditários, o câncer de mama em pacientes PAM apresenta uma manifestação tardia, entre a quinta e oitava década de vida (Vogt *et al.*, 2009).

Um estudo holandês realizado por Wasielewski em 2010, reportou uma frequência de mutações em MUTYH de 4% em famílias com síndrome de mama e cólon hereditário (HBCC - Hereditary Breast and Colorectal Cancer).

Em estudo com 276 pacientes europeus com PAM, foi encontrado um baixo a moderado, mas significativo aumento na incidência de câncer de ovário e de bexiga, assim como de câncer de pele. O risco de câncer de bexiga em PAM, foi semelhante ao risco de cânceres do trato urinário e pulmonar na síndrome de Lynch. No entanto, em contraste com a síndrome de Lynch, os cânceres não se localizam na parte superior do trato urinário (pelve renal, ureter) (Vogt *et al.*, 2009). Também foi relatado câncer de ovário, no qual em um dos casos, a histologia era conhecida e se tratava de um cistoadenocarcinoma mucinoso. Além disso, também foram relatados três casos de carcinoma de tireóide, cada um com diferente histologia (Vogt *et al.*, 2009; Ponti *et al.*, 2005). Em outro estudo recente, mutações bialélicas em MUTYH p.Q338H, mostraram associação significativa com o risco de câncer de pulmão em fumantes (Miyaiishi *et al.*, 2009).

A ausência de características patológicas específicas e a falta de antecedentes familiares de CCR, nestes indivíduos, indica que a identificação de casos de CCR associados ao gene MUTYH pode ser difícil, o que ressalta a importância da avaliação molecular do indivíduo e familiares, para o devido aconselhamento genético e manejo das famílias (Nielsen *et al.*, 2010).

## 10. JUSTIFICATIVA

A literatura internacional indica que mutações bi-alélicas no gene *MUTYH* podem estar associadas, com relativa frequência, ao fenótipo de polipose colônica, seja ela clássica ou atenuada, ou mesmo a casos de CCR diagnosticado antes dos 60 anos de idade sem pólipos colônicos identificáveis. A penetrância de CCR em pacientes com PAM é em torno de 19% até os 50 anos de idade, 43% até os 60 anos (Lubbe *et al*, 2009) e podendo chegar a 100% caso não haja o acompanhamento correto. A atual penetrância para o CCR é possivelmente maior, pois o desenvolvimento do CCR pode ser evitado através de programas de rastreamento intensivo.

O diagnóstico molecular da síndrome da Polipose Associada ao gene *MUTYH* é de grande utilidade como diagnóstico diferencial e principalmente para direcionar o tratamento e o acompanhamento de pacientes com esta síndrome, em vista que não se tem relatos da mesma na população do Rio Grande do Sul ou do Brasil.

## **11. OBJETIVOS**

### **11.1 Objetivo Geral**

Estimar a frequência das mutações p.Y179C e p.G396D do gene *MUTYH* em indivíduos diagnosticados com câncer colorretal e/ou polipose colônica no estado do Rio Grande do Sul.

### **11.2 Objetivo Específico**

Correlacionar os resultados moleculares a variáveis clínicas do indivíduo (fenótipo sindrômico, presença de consangüinidade, número e tipo de pólipos colônicos associados, presença ou ausência de CCR associado, idade média ao diagnóstico de CCR, características do tumor ao diagnóstico).

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Snover DC, Jass JR, Fenoglio-Preiser C, Batts KP. Serrated polyps of the large intestine: a morphologic and molecular review of an evolving concept. *Am J Clin Pathol* 2005; 124: 380 – 391.
- Aaltonen and de la Chapelle. Cancer risk in mutation carriers of DNA-mismatch-repair genes. *International Journal of Cancer* (1999); 81: 214–218
- Abdel-Rahman WM, Peltomäki P. Lynch syndrome and related familial colorectal cancers. *Critical Review Oncology*. (2008);14(1):1-22; discussion 23-31.
- Aceto G, Cristina Curia M, Veschi S., *et al.* Mutations of *APC* and *MYH* in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat* (2005); 26 (4): 394.
- Ajith Kumar VK, Gold JA, Mallon E, *et al.* Sebaceous adenomas in an *MYH* associated polyposis patient of Indian (Gujarati) origin. *Familial Cancer* (2008); 7:187–189
- Al Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, *et al.* Inherited variants of *MYH* associated with somatic G:C-T:A mutations in colorectal tumors. *Nature Genetics* 2002; 30:227–232.
- Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H *et al.* *MUTYH*-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006; 119 (4): 807–814.
- Arnold CN, Goel A, Blum HE, Boland CR. Molecular pathogenesis of colorectal cancer: implications for molecular diagnosis. *Cancer* (2005); 15;104(10): 2035-47.
- Ashton KA, Proietto A, Otton G, Symonds Ian, Scott RJ., *et al.* Genetic variants in *MUTYH* are not associated with endometrial cancer risk. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* (2009) vol. 7 (1) pp. 3
- Avezzu A, Agostini M, Pucciarelli S, *et al.*: The role of *MYH* gene in genetic predisposition to colorectal cancer: another piece of the puzzle. *Cancer Lett* (2008), 268: 308-313.
- Baglioni S, Melean G, Gensini F, *et al.* A kindred with *MYH*-associated polyposis and pilomatricomas. *Am J Med Genet* (2005);134(2):212–214.
- Balaguer F, Castells A. Identification of Lynch syndrome: are we close to the best strategy? *Gastroenterology* (2007);133(1): 353-5.
- Baudhuin LM, Mai M, French AJ, *et al.* Analysis of *hMLH1* and *hMSH2* gene dosage alterations in hereditary nonpolyposis colorectal cancer patients by novel methods. *J Mol Diagn.* (2005);7(2):226-35.
- Barnes CJ, Cameron IL, Hardman WE, *et al.* Non-steroidol anti-inflammatory drug effect on crypt cell proliferation and apoptosis during initiation of rat colon carcinogenesis. *British journal of Cancer* (1998) vol. 77 (4) pp. 573-580
- Barnetson RA, Devlin L, Miller J, *et al.* Germline mutation prevalence in the base excision repair gene, *MYH*, in patients with endometrial cancer. *Clin Genet* (2007); 72:551-5.
- Baron JA, Beach M, Mandel JS, *et al.* Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. *The New England of Journal Medicine* (1999); 340:101–7
- Berx G, Becker KF, Hofler H, *et al.* Mutations of the human E-cadherin (*CDH1*) gene. *Human Mutation* (1998) 12: 226-237.

Bhathal PS, Hughes NR, Goodman ZD . The so-called bile duct adenoma is a peribiliary gland hamartoma. *American Journal Surgery Pathology* (1996) 20: 858-864.

Bianchi L . Glycogen storage disease I and hepatocellular tumours. *European Journal of Pediatrics*(1993) 152 Suppl 1: 1995.

Bianchi LK, Burke CA, Bennett AE, *et al.* Fundic gland polyp dysplasia is common in familial adenomatous polyposis. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2008); 6: 180–5.

Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, *et al.* 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);15;58(22):5248-57.

Boparai K, Dekker E, Eeden Sv, *et al.* Hyperplastic Polyps and Sessile Serrated Adenomas as a Phenotypic Expression of MYH-Associated Polyposis. *YGAST* (2008); vol. 135 (6) pp. 2014-2018.

Bostick RM, Fosdick L, Grambsch P. Calcium and colorectal epithelial cell proliferation in sporadic adenoma patients: a randomized, double-blinded, placebo-controlled clinical trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (1995); 87(17):1307-131.

Bougatef K, Marrakchi R, Kourda N, *et al.* Somatic mutation of MutYH in Tunisian patients with sporadic colorectal cancer. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* (2007); vol. 21 (6):372-374.

Bouguen G, Manfredi S, Blayau M, *et al.* Colorectal adenomatous polyposis associated with MYH mutations: genotype and phenotype characteristics. *Disease of Colon Rectum* (2007);50:1612–7.

Broome U, Lindberg G, Löfberg R. Primary sclerosing cholangitis in ulcerative colitis: a risk factor for the development of dysplasia and DNA aneuploidy? *Gastroenterology* (1992); 102:1877-1880.

Buecher B, Baert-Desurmont S, Leborgne J, *et al.* Duodenal adenocarcinoma and Mut Y human homologue-associated polyposis. *Eur J Gastroenterol Hepatol* (2008); 20:1024-1027.

Bulow S, Berk T, Neale K. The history of familial adenomatous polyposis. *Familial Cancer* (2006);5:213–20.

Buttin BM, Powell MA, Mutch DG, *et al.* Increased risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer-associated synchronous and metachronous malignancies in patients with microsatellite instability-positive endometrial carcinoma lacking MLH1 promoter methylation. *Clinical Cancer Research* (2004);10(2):481-90

Casper M, Plotz G, Juengling B, *et al.* Adenoma Development in a Patient with MUTYH-Associated Polyposis (MAP): New Insights into the Natural Course of Polyp Development. *Digestive Diseases and Sciences* (209) vol. 55 (6) pp. 1711-1715.

Castells A. MYH-Associated Polyposis: Adenomas and Hyperplastic Polyps, Partners in Crime? *YGAST* (2008); vol. 135 (6) pp. 1857-1859

Cheadle JP, Sampson JR. MUTYH-associated polyposis—from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)* (2007); 6(3): 274–9.

Chiang J, Yeh C, Changchien C, *et al.* Mucinous adenocarcinoma showing different clinicopathological and molecular characteristics in relation to different colorectal cancer subgroups. *International Journal of Colorectal Disease* (2010); vol. 25 (8) pp. 941-947

- Chirieac LR, Shen L, Catalano PJ, et al. Phenotype of microsatellite-stable colorectal carcinomas with CpG island methylation. *American Journal Surgical Pathology* (2005); 29:429–36.
- Chmiel NH., Golinelli MP., Francis AW. and David SS. Efficient recognition of substrates and substrate analogs by the adenine glycosylase MutY requires the C-terminal domain. *Nucl. Acids Res* (2001); 29, 553–564.
- Cho and Smith-Warner. Dairy foods, calcium, and colorectal cancer: a pooled analysis of 10 cohort studies. *Journal of the National Cancer Institute* (2004) vol. 96 (13) pp. 1015-1022.
- Chow E, Lipton L, Lynch E, et al. Hyperplastic polyposis syndrome: phenotypic presentations and the role of MBD4 and MYH. *Gastroenterology* (2006); 131:30–39.
- Church J. Familial adenomatous polyposis. *Surgical oncology clinics of North America* (2009) vol. 18 (4) pp. 585.
- Cleary S, Cotterchio M, Jenkins M, et al. Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case–control study. *Gastroenterology* (2009); 136:1251–60.
- Colebatch A, Hitchins M, Williams R, et al. The role of MYH and microsatellite instability in the development of sporadic colorectal cancer. *Br J Cancer* (2006); 95:1239–1243.
- Cravo M, Lage P, Albuquerque C, et al. BAT-26 identifies sporadic colorectal cancers with mutator phenotype: a correlative study with clinico-pathological features and mutations in mismatch repair genes. *The Journal of Pathology* (1999); vol. 188: pp. 252-257
- Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst* (2004);96(21):1631–4.
- D'Agostino VG, Minoprio A., Torreri P., et al. Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis, *DNA Repair* (2010), doi:10.1016/j.dnarep.2010.03.008
- David SS, O'Shea VL, Kundu S. Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* (2007); 447 (7147) pp. 941-950.
- de Ferro SM, Suspiro A, Fidalgo P, et al. Aggressive phenotype of MYH-associated polyposis with jejunal cancer and intra-abdominal desmoid tumor: report of a case. *Dis Colon Rectum* (2009); 52(4):742–5.
- de la Chapelle A. Genetic predisposition to colorectal cancer. *Nature Review Cancer* (2004); 4(10):769-80.
- Dingley KH, Curtis KD, Nowell S, et al. DNA and protein adduct formation in the colon and blood of humans after exposure to a dietary-relevant dose of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine. *Cancer Epidemiol Biomarkers* (1999); 8: 507-512.
- Dolwani S, Williams GT, West KP, et al. Analysis of inherited MYH/(MutYH) mutations in British Asian patients with colorectal cancer. *Gut* (2007); 56:593.
- Emma E.J., Ross A., Muntinghe FL., et al. Patients with Familial Adenomatous Polyposis. *Annals of Surgical Oncology* (2009); 16:1449-1450.
- Enholm S, Hienonen T, Suomalainen A, et al. Proportion and phenotype of MYH-associated colorectal neoplasia in a population-based series of Finnish colorectal cancer patients. *Am J Pathol* (2003); 163(3):827–32.

Estimativa 2010-Incidência de câncer no Brasil, Inca. Disponível em [www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br)

Farinati, F., Cardin, R., Degan, P., *et al.* Oxidative DNA damage accumulation in gastric carcinogenesis. *Gut*, (1998) 42, 351-356.

Fearon RE and Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* (1990); Vol. 61: 759-767

Firth HV, Hurst JA, Hall JG. Oxford Desk reference: Clinical Genetics - (2005) -pp 757. ISBN 0-19-262896-8.

Flood A, Peters U, Chatterjee N, *et al.* Calcium from diet and supplements is associated with reduced risk of colorectal cancer in a prospective cohort of women. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* (2005); 14 (1) pp. 126-132.

Fortini, P, Pascucci, B, Parlanti, *et al.* The base excision repair: mechanisms and its relevance for cancer susceptibility. *Biochimie* 85 (2003) 1053–1071.

Fortini P, Parlanti E, Sidorkina OM, *et al.* The type of DNA glycosylase determines the base excision repair pathway in mammalian cells. *J Biol Chem* (1999); 274: 15230-15236.

Fredeunheim JOL, Graham S, Marshall JR. Folate intake and carcinogenesis of the colon and rectum. *International journal of Epidemiology* 1991; 20: 368-374.

Fromme JC, Banerjee A, Huang SJ, Verdine GL. Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature* (2004); 427:652-656.

Fujiwara T, Stolker JM, Watanabe T, Rashid A. Accumulated clonal genetic alterations in familial and sporadic colorectal carcinomas with widespread instability in microsatellite sequences. *American Journal of Pathology* (1998); 153: 4: 1063-1078.

Gallagher MC, Phillips RK, Bulow S. Surveillance and management of upper gastrointestinal disease in Familial Adenomatous Polyposis. *Fam Cancer* (2006); 5:263–73.

Galiatsatos and Foulkes. Familial adenomatous polyposis. *The American journal of gastroenterology* (2006); vol. 101 (2) pp. 385-398.

Garro AJ, Lieber CS. Alcohol and Cancer. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. (1990) vol. 30 pp. 219-249

Gillen CD, Walmsley RS, Prior P, *et al.* Icteric colitis and Crohn's disease: a comparison of the colorectal cancer risk in extensive colitis. *Gut International journal of Gastroenterology and Hepatology* (1994) 35: 1590-1592.

Giovannucci E. Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterology clinics of North America* (2002); 31 (4) pp. 925-43

Giovannucci E, Rimm EB, Ascherio A. Alcohol, low-methionine-low-folate diets, and risk of colon cancer in men. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (1995) vol. 87 (4) pp. 265-273.

Giovannucci E, Rimm EB, Stampfer MJ, *et al.* A prospective study of cigarette smoking and risk of colorectal adenoma and colorectal cancer in US men. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (1994) vol. 86 (3) pp. 183-191

Giovannucci E, Stampfer MJ, Colditz GA, *et al.* Folate, methionine, and alcohol intake and risk of colorectal adenoma. *J Natl Cancer inst* (1993); 85:875-24.



Gismondi V, Meta M, Bonelli L, *et al.* Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* (2004); 109(5): 680–4.

Gomez-Fernandez N, Castellvi-Bel S, Fernandez-Rozadilla C, *et al.* Molecular analysis of the APC and MUTYH genes in Galician and Catalanian FAP families: a different spectrum of mutations? *BMC Med Genet* (2009); 10:57.

Grau MV, Baron JA, Sandler RS. Vitamin D, calcium supplementation, and colorectal adenomas: results of a randomized trial. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (2003) 95(23):1765-1771;

Groen E, Roos A, Muntinghe F, *et al.* Extra-intestinal manifestations of familial adenomatous polyposis. *Annals of surgical oncology* (2008); vol. 15 (9) pp. 2439-2450

Guan Y., Manuel R., Arvai A., Parikh S. MutY catalytic core, mutant and bound adenine structures define specificity for DNA repair enzyme superfamily. *Nat Struct Biol.* (1998); 5(12):1058-64.

Gunter MJ, Stolzenberg-Solomon R, Cross AJ, *et al.* A prospective study of serum C-reactive protein and colorectal cancer risk in men. *Cancer Research* (2006) vol. 66 (4) pp. 2483-2487

Guillen-Ponce C, Castillejo A, Barbera VM, *et al.* Biallelic MYH germline mutations as cause of Muir-Torre syndrome. *Fam Cancer* (2010); 9(2):151–4.

Hadley DW, Jenkins JF, Steinberg SM, *et al.* Perceptions of cancer risks and predictors of colon and endometrial cancer screening in women undergoing genetic testing for Lynch syndrome. *Journal of Clinical Oncology* 2008;20;26(6):948-54.

Half E, Bercovich D, Rozen P. Familial adenomatous polyposis. *Orphanet journal of rare diseases* (2009) vol. 4 (1) pp. 22.

Halford SE, Rowan AJ, Lipton L, *et al.* Germline mutations but not somatic changes at the MYH locus contribute to the pathogenesis of unselected colorectal cancers. *Am J Pathol* (2003);162:1545–1548.

Hamilton S.R., Aaltonen L.A. (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System.* IARC Press: Lyon 2000.

Hartman TJ, Albert PS, Snyder K, *et al.* The association of calcium and vitamin D with risk of colorectal adenomas. *The American Society for Nutritional Sciences Journal of Nutrition* (2005):135:252-259.

Heinimann K, Scott RJ, Chappuis P, *et al.* N-acetyltransferase 2 influences cancer prevalence in hMLH1/hMSH2 mutation carriers. *Cancer Research* (1999) 59: 3038-3040.

Hyman A. and Karsenti E. The role of nucleation in patterning microtubule networks. *Journal of Cell Science* (1998); Vol 111, Issue 15 2077-2083.

Isidro F., Laranjeira A., Pires JL., *et al.* Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas, *Human Mutat.* (2004); 24:353–354.

Iyas M, Straub J, Tomlinson I, *et al.* Genetic pathways in colorectal and other cancers<sup>1</sup>. *European Journal of Cancer* (1999) vol. 35 (14) pp. 1986-2002.

Itzkowitz and Yio. Inflammation and cancer IV. Colorectal cancer in inflammatory bowel disease: the role of inflammation. *American Journal of Physiology Gastrointestinal Liver Physiology* (2004); vol. 287 pp. G7-G17.

- Jass JR. Colorectal polyposis: from phenotype to diagnosis. *Pathology-Research and Practice* (2008) ;vol. 204 (7) pp. 431-447.
- Jass JR, Do KA, Simms LA, *et al.* Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut* (1998); 42: 673-679.
- Jenkins MA, Croitoru ME, Monga N., *et al.* Risk of colorectal cancer in monoallelic and biallelic carriers of MUTYH mutations: a population-based case-family study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* (2006); 15:312–314.
- Jo W-S, Bandipalliam P, Shannon KM, *et al.* Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2005); 3:1022–8.
- Jones S, Emmerson P, Maynard J *et al.* Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C – >T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002; 11(23): 2961–2967.
- Jones N, Vogt S, Nielsen M., *et al.* Increased colorectal cancer incidence in obligate carriers of heterozygous mutations in MUTYH. *Gastroenterology* (2009); 137:489–494.
- Kairupan CF, Meldrum CJ, Crooks R, *et al.* Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *Int J Cancer* (2005);116:73-77.
- Kairupan and Scott. Base excision repair and the role of MUTYH. *Hereditary Cancer in Clinical Practice* (2007); 5(4) pp. 199-209.
- Kalgutkar AS, Kozak KR, Crews BC, *et al.* Covalent Modification of Cyclooxygenase-2 (COX-2) by 2-Acetoxyphenyl Alkyl Sulfides, a New Class of Selective COX-2 Inactivators. *J. Med.* (1998) vol. 41 (24) pp. 4800-4818.
- Kanter-Smoler G, Bjork J, Fritzell K, *et al.* Novel findings in Swedish patients with MYH-associated polyposis: mutation detection and clinical characterization. *Clin Gastroenterol Hepatol* (2006); 4:499-506.
- a. Kim DW, Kim IJ, Kang HC, *et al.* Germline mutations of the MYH gene in Korean patients with multiple colorectal adenomas. *Int J Colorectal Dis* (2007); 22:1173–8.
- b. Kim JC, Ka IH, Lee YM, *et al.* MYH, OGG1, MTH1, and APC alterations involved in the colorectal tumorigenesis of Korean patients with multiple adenomas. *Virchows Arch* (2007);450:311–9.
- Kopacova M, Tacheci I, Rejchrt S, *et al.* Peutz-Jeghers syndrome: Diagnostic and therapeutic approach. *World Journal of Gastroenterology* (2009) vol. 15 (43) pp. 5397-5408
- Lagerstedt Robinson K, Liu T, Vandrovicova J, *et al.* Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) diagnostics. *JNCI-Journal National Cancer Institute* (2007); 99:291–9.
- Le Page F, Randrianarison V, Marot D, *et al.* BRCA1 and BRCA2 are necessary for the transcription-coupled repair of the oxidative 8-oxoguanine lesion in human cells. *Cancer Res* (2000); 60:5548-52.
- Lefevre JH, Rodrigue CM, Mourra N, *et al.* Implication of MYH in colorectal polyposis. *Ann Surg* (2006); 244:874–879.
- Leggett B., Whitehall V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. *Gastroenterology* (2010); 138:2088–2100.

Lengauer C., Kinzler K.W. and Vogelstein B. Genetic instabilities in human cancers. *Nature* (1998), 396, 643–649.

Lindor NM., Greene MH. The concise handbook of family cancer syndromes. Mayo Familial Cancer Program. *J Natl Cancer Inst.* (1998); 15;90(14):1039-71.

Lindor N. Hereditary colorectal cancer: MYH-associated polyposis and other newly identified disorders. *Best practice & research Clinical gastroenterology* (2009) vol. 23 (1) pp. 75-87

Lipton SE., Halford V., Johnson MR., *et al.* Carcinogenesis in MYH-associated polyposis follows a distinct genetic pathway, *Cancer Res* (2003); 63 7595–7599.

Lipton L, Tomlinson I. The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Familial Cancer* (2006);5:221–226.

Liu C e Crawford JM: O Trato Gastrointestinal in: Vinay Kumar, Abul K. Abbas, Nelson Fausto. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7.ed. Elsevier, 2005. pp.1504.ISBN 85-352-1391-0899-913.

Loon B van, Markkanen E, HäüBscher U. Oxygen as a friend and enemy: How to combat the mutational potential of 8-oxo-guanine. *DNA Repair* (2010) vol. 9 (6) pp. 604-616.

Lu HK, Broaddus RR. Gynecologic Cancers in Lynch Syndrome/HNPCC. *Fam Cancer* (2005);4(3):249-54,

Lu AL., Bai H., Shi G., Chang DY. MutY and MutY homologs (MYH) in genome maintenance. *Front. Biosci.* (2006); 11: 3062-3080.

Lu KH, Schorge JO, Rodabaugh KJ, Daniels MS, Sun CC, Soliman PT, White KG, Luthra R, Gershenson DM, Broaddus RR. Prospective determination of prevalence of lynch syndrome in young women with endometrial cancer. *J Clin Oncol* (2007);20;25(33):5158-64.

Lubbe SJ, Di Bernardo MC, Chandler IP, *et al.* Clinical implications of the colorectal cancer risk associated with MUTYH mutation. *J Clin Oncol* (2009); 27(24): 3975–80.

Luchtenborg M, Weijenberg MP, Kampman E, *et al.* Cigarette smoking and colorectal cancer: APC mutations, hMLH1 expression, and GSTM1 and GSTT1 polymorphisms. *American Journal of Epidemiology* (2005) vol. 161 (9) pp. 806–815

Lynch H, Lynch P, Lanspa S, Snyder C, Lynch J, Boland CI. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical Genetics* (2009) vol. 76 (1): 1-18.

Michels KB, Giovannucci E, Chan AT, *et al.* Fruit and vegetable consumption and colorectal adenomas in the Nurses' Health Study. *Cancer Research* (2006) vol. 66 (7) pp. 3942-53.

Miyaki, M., Iijima T., Yamaguchi T., *et al.* Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat. Res.* 2005, 578: 430-433.

Munkholm. Review article: the incidence and prevalence of colorectal cancer in inflammatory bowel disease. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* (2003); vol. 18 (2) pp. 1-5.

Murata M, Tagawa M, Watanabe S, *et al.* Genotype difference of aldehyde dehydrogenase 2 gene in alcohol drinkers influences the incidence of Japanese colorectal cancer patients. *Jpn Journal Cancer Research* (1999); 90: 711-719.

Naccarati A, Pardini B, Hemminki K, Vodicka P. Sporadic colorectal cancer and individual susceptibility: a review of the association studies investigating the role of DNA repair genetic

polymorphisms. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research* (2007) vol. 635 (2-3): 118-145.

Nagorni A. Genetics of colorectal cancer. *Facta Universitatis, Series Medicine and Biology* (2002); 9(2):142-9.

Narayan and Roy. Role of *APC* and DNA mismatch repair genes in the development of colorectal cancers. *Molecular Cancer* (2003); vol. 2 (41).

Neeley WL., Essigmann JM. Mechanisms of formation, genotoxicity, and mutation of guanine oxidation products. *Chem. Res. Toxicol* (2006). 19, 491–505.

Nielsen M, Franken PF, Reinards TH, *et al.* Multiplicity in polyp count and extra-colonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet* (2005); 42(9):e54.

a) Nielsen M, de Miranda NF, van PM, *et al.* Colorectal carcinomas in MUTYH-associated polyposis display histopathological similarities to microsatellite unstable carcinomas. *BMC Cancer* (2009); 9: 184.

b) Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N., *et al.* Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients With MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* (2009); 136 (2): 471–476.

Nielsen M., Morreau H., Vasen HFA., *et al.* MUTYH-associated polyposis (MAP). *Crit Rev Oncol/Hematol* (2010); doi:10.1016/j.critrevonc.2010.05.011.

Nieuwenhuis MH., Vasen HFA. Correlations between mutation site in *APC* and phenotype of familial adenomatous polyposis (FAP): A review of the literature. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 61 (2007) 153–161.

O'Brien V, Brown R. Signalling cell cycle arrest and cell death through the MMR system. *Carcinogenesis* (2006);27(4):682-92.

O'Brien MJ. Hyperplastic and Serrated Polyps of the Colorectum. *Gastroenterol Clin N Am* 36 (2007) 947–968.

Ohtsubo K., Nishioka Y., Imaiso S.,*et al.* Identification of human MutY homolog (hMYH) as a repair enzyme for 2-hydroxyadenine in DNA and detection of multiple forms of hMYH located in nuclei and mitochondria, *Nucleic Acids Res* (2000); 28 1355–1364.

O'Shea AM, Cleary SP, Croitoru MA, *et al.* Pathological features of colorectal carcinomas in MYH-associated polyposis. *Histopathology* (2008), 53: 184-194.

Owen RW. Dietary and chemopreventive strategies. *Recent Results Cancer Research* (1998) 146: 195-213.

Parker A., Gu Y., Lu AL. Purification and characterization of a mammalian homolog of *Escherichia coli* MutY mismatch repair protein from calf liver mitochondria. *Nucl. Acids Res* (2000); 28, 3206–3215.

Paz-Elizur T., Sevilya Z., Leitner-Dagan Y., Elinger D., Roisman L., Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer letters* (2008) vol. 266 (1) pp. 60

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

- Pino M and Chung C. The Chromosomal Instability Pathway in Colon Cancer. *YGAST* (2010); vol. 138 (6) pp. 2059-2072
- Ponti G, Ponz de Leon M, Maffei S, *et al.* Attenuated familial adenomatous polyposis and Muir-Torre syndrome linked to compound biallelic constitutional MYH gene mutations. *Clin Genet* (2005); 68(5):442-447
- Potter, J.D., Colorectal cancer: molecules and populations. *Journal of The National Cancer Institute.* (1999); 91(11):916-932. (a)
- Potter, J.D., Fiber and colorectal cancer-where to now? *New England Journal Medicine* (1999); 340:223-24. (b)
- Potter J, Slattery ML, Bostick RM, *et al.* Colon cancer: a review of the epidemiology. *Epidemiology Review* (1993); Vol 15-2: 499-545.
- Poulsen ML, Bisgaard ML. MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Curr Genomics* (2008); 9(6):420-35.
- Purdie CA, Piris J. Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* (2000); 36: 121-126.
- Rafter J, Glinghammar B. Interactions between the environment and genes in the colon. *European Journal Cancer Prevention* (1998); vol 7(2): S69-S74.
- Ramji, A. e Yoshida EM. Vilous Adenoma. (2009). Disponível em: <http://emedicine.medscape.com/article/170283-overview>
- Rashid A, Zahurak M, Goodman SN, *et al.* Genetic epidemiology of mutated K-ras proto-oncogene, altered suppressor genes, and microsatellite instability in colorectal adenomas. *Gut* (1999); vol 44: 826-833.
- Rositto MA, Tarta C, Damim DC, Contu PC *et al.*, *Manual de Proctologia - Porto Alegre: editora Livre 2005.*
- Rustgi, A. The genetics of hereditary colon cancer. *Genes & development* (2007); 21: 2525-2538.
- Sampson JR, Dolwani S, Jones S, *et al.* Autosomal recessive colorectal adenomatous polyposis due to inherited mutations of MYH. *Lancet* (2003); 362(9377): 39-41.
- Sampson and Jones. MUTYH-associated polyposis. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* (2009); vol. 23 (2) pp. 209.
- Sasaki S, Masaki T, Umetani N, *et al.* Characteristics in primary signet-ring cell carcinoma of the colorectum, from clinico-pathological observations. *Japanese Journal of Clinical Oncology* (1998);28: 202-206.
- Schulmann K, Pox C, Tannapfel A, Schmiegel W. The patient with multiple intestinal polyps. *Best Practice & Research Clinical Gastroenterology* (2007); vol. 21 (3) pp. 409-426
- Shia J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome. Part I. The utility of immunohistochemistry. *J Mol Diagn.* (2008);10(4):293-300.
- Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, *et al.* Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* (2003); 348(9):791-9.

Slattery ML, Curtin K, Anderson K, *et al.* Associations between cigarette smoking, lifestyle factors, and microsatellite instability in colon tumors. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* (2000); vol. 92 (22) pp. 1831-1836.

Slattery ML, Potter JD, Samowitz W, *et al.* Methylene-tetrahydrofolate reductase, diet, and risk of colon cancer. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention* (1999); 8: 513-518.

Slattery ML, West DW, Robison LM, *et al.* Tobacco, alcohol, coffee, and caffeine as risk factors for colon cancer in a low-risk population. *Epidemiology* (1990); vol. 1 (2) pp. 141-145.

Slupska, MM, Baikalov, C, Luther, WM, *et al.* Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *Journal of bacteriology* (1996) vol. 178 (13) pp. 3885.

Sociedade Brasileira de Endoscopia Digestiva. Rastreamento e Vigilância do Câncer Colo-retal. Prevenção secundária e detecção precoce. Disponível em:  
<[http://www.sobed.org.br/web/arquivos\\_antigos/pdf/diretrizes/Screening.pdf](http://www.sobed.org.br/web/arquivos_antigos/pdf/diretrizes/Screening.pdf)> Acesso em: 10 fev. 2011.

South CD, Hampel H, Comeras I, *et al.* The frequency of Muir-Torre syndrome among Lynch syndrome families. *J Natl Cancer Inst* (2008); 100:277–81.51.

Steinmetz and Potter. Vegetables, Fruit, and Cancer Prevention: A Review. *Journal of the American Dietetic Association* (1996); Vol 96. 10: 1996p171.

Stormorken AT, Hoff G, Norstein J., *et al.* MUTYH mutations do not cause HNPCC or lateonset colorectal cancer. *Hered Cancer Clin Pract* (2006); 2:90–93

Takayama T, Miyanishi K, Hayashi T, *et al.* Colorectal cancer: genetics of development and metastasis. *Journal of Gastroenterology* (2006); vol. 41 pp. 185-192

Takayama T, Katsuki S, Takahashi Y, *et al.* Aberrant crypt foci of the colon as precursors of adenoma and cancer. *New England Journal of Medicine* (1998); 339:1277–1284.

Takao, M., Aburatani, H., Kobayashi, K., Yasui, A. Mitochondrial targeting of human DNA glycosylases for repair of oxidative DNA damage. *Nucl. Acids Res* (1998); 26, 2917–2922.

Tang WY, Elnatan J, Lee YS, *et al.* c-Ki-ras mutations in col- orectal adenocarcinomas from a country with a rapidly changing colorectal cancer incidence. *British Journal of Cancer* (1999); 81: 237-241.

Tao H, Shinmura K, Hanaoka T., *et al.* A novel splice-site variant of the base excision repair gene MYH is associated with production of an aberrant mRNA transcript encoding a truncated MYH protein not localized in the nucleus. *Carcinogenesis* (2004); 25:1859–1866.

Thomas RM, Sobin LH. Gastrointestinal cancer. *Cancer* (1995); 75: 154-170.

Tricarico R, Bet P, Ciambotti B, *et al.* Endometrial cancer and somatic G>T KRAS transversion in patients with constitutional MUTYH biallelic mutations. *Cancer Lett* (2009); 274:266-70.

Tsuji M, Kawano S, Tsuji S, *et al.* Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* (1998); vol. 93 pp. 705-716.

Umar A, Boland C, Terdiman J, *et al.* Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability. *Journal of the National Cancer Institute* (2004); vol. 96 (4) pp. 261-268.

Vandrovцова J, Stekrova J, Kebrdlova V, Kohoutova M. Molecular analysis of the *APC* and *MYH* genes in Czech families affected by FAP or multiple adenomas: 13 novel mutations. *Hum Mutat* (2004); 23(4):397.

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

Varesco L. Familial adenomatous polyposis: genetics and epidemiology. *Techniques in Coloproctology* (2004); vol. 8 pp. 305-308.

Venesio T., Molatore S., Cattaneo F., *et al.* High frequency of *MYH* gene mutations in a subset of patients with familial adenomatous polyposis. *Gastroenterology* (2004); 126: 1681-1685.

Vogt S, Jones N, Christian D,*et al.* Expanded extracolonic tumor spectrum in *MUTYH*-associated polyposis. *Gastroenterology* (2009);137:1976–85.

Volk DE., House PG., Thiviyanathan V., *et al.* Structural similarities between MutT and the C-terminal domain of MutY. *Biochemistry* 2000, 39: 7331-7336.

Wasielowski M, Out AA, Vermeulen J., *et al.* Increased *MUTYH* mutation frequency among Dutch families with breast cancer and colorectal cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2010 [epub Feb 27].

Watson P, Riley B. The tumor spectrum in the Lynch syndrome. *Fam Cancer* (2005);4(3):245-8.

Weinberg, Robert . *The Biology of Cancer*. 1o edição, Garland Science (2006).

Wirtzfeld DA, Petrelli NJ, Rodriguez-Bigas MA, *et al.* Hamartomatous polyposis syndromes: molecular genetics, neoplastic risk, and surveillance recommendations. *Annals of Surgical Oncology* (2001); 8: 319-327

World Cancer Research Fund/American Institute for Cancer Research. Food expert panel (WRCF) (1997): *Nutrition and the Prevention of Cancer: A Global Perspective*. Washington, DC: WCRF/AICR.

Yanaru-Fujisawa R, Matsumoto T, Ushijima Y, *et al.* Genomic and functional analyses of *MUTYH* in Japanese patients with adenoma- tous polyposis. *Clin Genet* (2008); 73:545–53.

Yantiss, Rhonda K. Serrated colorectal polyps and the serrated neoplastic pathway: Emerging concepts in colorectal carcinogenesis. *Current Diagnostic Pathology* (2007) 13, 456–466.

**12. ARTIGO CIENTÍFICO:**

***“FREQUENCY OF THE COMMON GERMLINE MUTYH MUTATIONS P.G396D AND P.Y179C IN PATIENTS WITH COLORECTAL CANCER FROM SOUTH BRAZIL”***

Artigo a ser submetido à revista *INTERNATIONAL JOURNAL OF COLORECTAL DISEASE*



**Frequency of the common germline *MUTYH* mutations p.G396D and p.Y179C in patients diagnosed with colorectal cancer in Southern Brazil.**

Pitroski, CE<sup>1,2</sup>, Cossio SL<sup>1,3</sup>, Koehler-Santos P<sup>1,2</sup>, Graudenz M<sup>2,4</sup>, Prolla JC<sup>4</sup>, Prolla P<sup>1-3,7,8\*</sup>.

<sup>1</sup>Laboratório de Medicina Genômica – Centro de Pesquisa Experimental – Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)

<sup>2</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Médicas – Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS)

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Genética Médica Populacional - INAGEMP

<sup>4</sup>Departamento de Patologia – UFRGS

<sup>5</sup>Departamento de Medicina Interna - UFRGS

<sup>6</sup>Programa de Pós Graduação em Medicina: Ciências Gastroenterológicas - UFRGS

<sup>7</sup>Departamento de Genética - UFRGS

<sup>8</sup>Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular - UFRGS

(\*) Correspondence to:

Patricia Ashton-Prolla, MD, PhD  
Departamento de Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) and Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Rua Ramiro Barcelos 2350, CEP: 90035-903 - Porto Alegre - RS, Brazil  
e-mail: [pprolla@hcpa.ufrgs.br](mailto:pprolla@hcpa.ufrgs.br)  
Tel/Fax.: + 55 51 3359 8011

## ABSTRACT

**Introduction:** *MUTYH* Associated Polyposis (MAP) syndrome is an autosomal recessive cancer predisposition syndrome associated with the development of colorectal tumors and colonic polyps at an early age. MAP syndrome is associated to germline biallelic mutations in the *MUTYH* gene which lead to deficient DNA repair through the Base-Excision Repair system and accumulation of G:C→T:A transversions in the genome. Occurrence of such mutations in oncogenes and tumor suppressor genes then drive colorectal carcinogenesis and are associated with the development of colonic polyps and tumors. Two common mutations, p.Y179C and p.G396D, are present in approximately 70-80% of MAP in European families with identified *MUTYH* mutations.

**Objectives:** The aim of this study was to assess the frequency of the germline *MUTYH* mutations p.Y179C and p.G396D in Brazilian patients with MAP and other hereditary colorectal cancer (CRC) phenotypes, as well as in sporadic CRC cases.

**Patients and Methods:** A total of 75 patients were included. Patients were classified as: MAP (n=15), Familial Adenomatous Polyposis (n=15), Lynch Syndrome (Amsterdam criteria, n=15 and Bethesda criteria, n=15) and Sporadic Colorectal Cancer. Samples were screened for the *MUTYH* mutations p.Y179C and p.G396D by allelic discrimination assays using allele-specific TaqMan® probes. All mutation-positive cases were sequenced for confirmation and in heterozygotes, the entire coding region of the gene was sequenced for other less common mutations.

**Results:** Biallelic germline *MUTYH* mutations were identified in 4 of 60 (6,6%) patients with a phenotype of hereditary colorectal cancer syndromes, including three patients with the MAP phenotype (two of which fulfilled also Bethesda criteria) and one patient with the FAP phenotype. Higher mutation detection rates (20%) were observed when only the subgroup of patients with the MAP phenotype was considered. In several mutation- positive individuals there was an overlap of clinical criteria, especially between the MAP phenotype and Bethesda criteria. These findings reinforce the importance of considering *MUTYH* mutation screening not only in MAP patients but also in those with other hereditary CRC phenotypes, in particular those with associated colonic polyposis.

**Conclusion:** Germline *MUTYH* mutation screening should be considered in the differential diagnosis of hereditary colorectal syndromes, and not only in MAP, but also in FAP and Bethesda criteria-positive families. Additional mutation screening studies of the *MUTYH* gene and analysis of the entire coding region of the gene in a larger number of Brazilian patients will be necessary to confirm these results and determine the validity and applicability of *MUTYH* mutation screening in families with selected hereditary colorectal cancer syndromes.

## INTRODUCTION

The *MUTYH* gene (MutY human homologue), localized between 1p34.2 and 1p33, is a member of the base-excision repair pathway and its product, the mutyh protein, is directly involved in the repair of oxidative DNA damage, especially damages caused by oxidation of guanine to 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine (8-oxoG) [1-2]. Biallelic loss of function mutations in *MUTYH* lead to increased G:C→T:A transversions in oncogenes and tumor suppressor genes, such as *KRAS* and *APC*, that play an important role in cellular proliferation of the colorectum [1]. The accumulation of somatic mutations in these and other genes related to colorectal carcinogenesis lead to the rapid development of colonic tumors. The occurrence of germline biallelic mutations in *MUTYH* is associated with the *MUTYH* Associated Polyposis (MAP) syndrome (OMIM# 608456), first described in 2002 [3].

MAP is an autosomal recessive cancer predisposition syndrome associated with the development of colorectal tumors and colonic (predominantly adenomatous) polyps at an early age. In addition, MAP is associated with extracolonic manifestations, including duodenal polyposis, and an increased predisposition to ovarian, bladder, skin and breast cancer. A variety of different benign cutaneous tumors were observed in MAP patients, such as sebaceous gland adenomas (SGA) and epitheliomas, and subcutaneous lipomas [4-6].

The MAP phenotype can partially overlap Familial Adenomatous Polyposis (classical FAP), Attenuated-FAP (AFAP) and, more rarely, Lynch Syndrome (LS) [7-14]. When compared to classical FAP patients, MAP patients tend to develop fewer adenomas at a later age [15,16]. Most MAP patients are diagnosed with colorectal adenomas during the 5th decade of life and about half of them also have colorectal cancer at the time of diagnosis [7,8,17]. A more discrete phenotype with a smaller number of adenomas or colorectal cancer without polyposis (fewer than ten adenomas) has also been described in *MUTYH* mutation carriers under the age of 60 years [18-20]. Usually, biallelic *MUTYH* mutation carriers have 10–99 adenomas, and less frequently, they develop more than 100 adenomas that mimics FAP (only two biallelic *MUTYH* mutation carriers with more than 500 polyps have been reported so far)[17]. Among FAP or AFAP patients without identifiable germline APC mutations, biallelic *MUTYH* mutations were found in about 28% and 14% of those with 10–100 and 100–1000 polyps, respectively. Balaguer *et al*, (2007) showed that the combination of more than 15 synchronous colorectal adenomas and CRC diagnosed under the age of 50 years correlated with biallelic *MUTYH* mutations with a sensitivity of 75% and a specificity of 93.8% [21]. Overall, biallelic germline *MUTYH* mutations are estimated to occur in 0.2% to 0.9% of all colorectal cancer cases [22].

More recently, in September of 2010, the *MUTYH* Leiden Open Variation Database (LOVD) described 296 *MUTYH* sequence variants (including point mutations and polymorphisms) demonstrating that the *MUTYH* gene harbors significant molecular

heterogeneity, depending of the population studied (available in [www.lovd.nl/MUTYH](http://www.lovd.nl/MUTYH)). The mutations initially identified by Al-Tassan and colleagues [1] were at highly conserved residues and included the two hotspot mutations: p.Y179C in exon 7 and p.G396D in exon 13. The p.Y179 mutation occurs in a genic-location equivalent to the Helix-hairpin-Helix (HhH) domain which plays an important role in 8-oxoG recognition and of binding with adenine mispair specificity, intercalation into the DNA duplex and stability of the protein-DNA complex. The other common mutation, p.G396, is located in the C-terminal domain, is also involved in 8-oxoG recognition and adenine mispair specificity, and is thought to be important for conformational flexibility of the mutyh protein [23-25]. D'Agostino *et al.* [25] demonstrated that the mutant p.Y179C mutyh protein was totally inactive, while the DNA-glycosylase activity of mutyh p.G382D was only slightly affected. Recently, Nielsen *et al.* showed that the phenotype in p.Y179C homozygotes was more severe than the one observed in p.G396D homozygotes [17]. Together, the two common hotspot mutations account for approximately 80% of all reported mutant alleles in Caucasian MAP patients [26].

Identification of biallelic *MUTYH* mutation carriers is important to direct clinical management decisions, considering that in mutation positive individuals, colonic surveillance should start at age 18–20 years and gastroduodenal surveillance at age 25–30 years [31]. In addition, identification of a biallelic carrier usually is associated with identification of additional at-risk siblings that may also benefit from increased colonic surveillance.

Considering that there is no data available on *MUTYH* genotypic and allelic frequencies in Brazilian patients with different colorectal cancer syndromes, the aim of this study was to assess, in an exploratory approach, the frequency of the two hotspot *MUTYH* mutations (p.Y179C and p.G382D) in Brazilian patients with clinical phenotypes MAP, FAP, Lynch syndrome and sporadic colorectal cancer.

## **PATIENTS AND METHODS**

The study population (n=75) consisted of 4 subgroups, including patients with clinical diagnoses of: (a) MAP syndrome (15 patients with 10 to 99 adenomatous polyps in the colorectum with or without CRC and a pedigree suggestive of recessive inheritance); (b) Familial Adenomatous Polyposis (15 patients with >100 colonic polyps and with or without CRC and other extra-colonic features); (c) Lynch Syndrome: 15 CRC patients fulfilling Amsterdam (LS-Am) and 15 CRC patients fulfilling Bethesda (LS-Bet) criteria; and (d) Sporadic Colorectal Cancer (SCRC): 15 patients with CRC diagnosed at age 60 years or older without a family history of CRC. This study was approved by the Institutional Ethics Committee and informed consent was obtained from all participants before recruitment. Clinical data of each patient were reviewed by at least two independent investigators,

including colonoscopy, pathology and surgical records. Family history and criteria for hereditary CRC syndromes were reviewed by at least two clinical geneticists independently.

## SCREENING FOR *MUTYH* MUTATIONS

Genomic DNA was extracted from peripheral blood using the Illustra™ blood genomicPrep Mini spin Kit (GE Healthcare) as described by the manufacturer, and DNA concentration and purity were assessed with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer (New England Biolabs). Samples were screened for *MUTYH* mutations p.Y179C (Assay-by designed by SM Service Applied Biosystems) and p.G396D (c\_27860252\_10) by allelic discrimination with allele-specific TaqMan® probes (Applied Biosystems). Samples were run on an MX 3000P™ qPCR System - Stratagene (Agilent Technologies Inc - Sta Clara, CA - USA), and allelic discrimination was performed using the Stratagene MxPro QPCR Software . To confirm *MUTYH* mutations detected by TaqMan assay, all mutation-positive samples were submitted to bidirectional gene sequencing (heterozygotes: entire coding region, exons 1–16 and flanking exon–intron boundaries; homozygotes: exon of interest) on an ABI PRISM 3130XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems by Life Technologies - Carlsbad, CA - USA) as described previously by Aretz S., 2006 [27].

## RESULTS

Clinical and demographic data of patients included in the study are summarized in Table 1. CRC was present in the majority of patients and, as expected, the age at CRC diagnosis correlated with the phenotype: earlier age at CRC diagnosis in patients with phenotypes of hereditary CRC as compared to those with sporadic CRC. In addition, most of the patients had a diagnosis of colonic polyps upon colonoscopy. A significant proportion of patients with confirmed colonic polyps (28/44, 63.8%) had 10-99 colonic polyps, a phenotype consistent either with AFAP, Lynch syndrome (Bethesda criteria) or MAP syndrome. Mucinous CRC was a reported feature of 10% (6/60) of the tumours.

The common germline *MUTYH* mutations, p.Y179C and p.G396D, were detected in homozygosity (2 cases) or heterozygosity (3 cases), and in the latter group, either with a WT counterpart allele or as compound heterozygotes with other less frequently described mutations (Table 2). Presence of at least one common mutant allele was observed in 5 (10.6%) out of 47 patients with colonic polyps. Overall, biallelic *MUTYH* mutations were identified in 4 (8.9%) of 30 patients with either FAP or MAP criteria, being three of these MAP families. An overlap of phenotypes was observed in some families and two of the mutation-positive MAP families also fulfilled Bethesda criteria. Detailed phenotypic/genotypic

characteristics and family histories of the five *MUTYH*-mutation carriers are described in Table 2 and depicted in Figure 1, respectively.

## DISCUSSION

Mutations causing MAP are distributed across the *MUTYH* locus, and various population-specific mutations have been reported. The presence of *MUTYH* germline mutations has been described in approximately 28% of individuals with the “oligopolyposis phenotype” (10-99 polyps) and 7-22% of those with the classical form of FAP [16; 27; 29-31]. It is also known that MAP patients can show a phenotypic overlap with patients fulfilling Bethesda criteria for Lynch syndrome depending on family size and tumor characteristics [9, 13, 31, 35]. In our study we also identified this overlap in some patients, with 5/15 MAP patients fulfilling Bethesda criteria and 2 of Bethesda patients fulfilling also MAP criteria. ,

Overall, we identified at least one allele carrying a *MUTYH* germline mutations in five patients of the entire case series. As expected, no mutation was identified in either the Lynch syndrome Amsterdam criteria group (these are expected to harbor deficiencies in the MMR system) or the sporadic CRC group. Among the five mutation-positive individuals, two, identified as “case 4” and “case 5” (Table 2) met clinical criteria for FAP syndrome. The more severe phenotype with over 100 polyps observed in “case 4” (p.Y179C homozygote) is consistent with recent clinical and functional studies published in the literature [1, 21, 28, 36]. Case 5, patient that also had classical FAP phenotype, was found to be heterozygous for a common *MUTYH* mutation and bidirectional sequencing of the entire *MUTYH* coding region did not identify abnormalities in the second allele. The personal and family history is typical for classical FAP in this case: four generations are affected by CRC and most of the affected individuals have hundreds of polyps. Although there has been some evidence suggesting that heterozygous mutations in *MUTYH* may be associated with an increased risk for CRC at later ages and mild polyposis, this genotype has not been associated with the fullblown FAP phenotype and thus, *APC* mutation testing must be performed to further investigate this particular case.

Regarding phenotype-genotype correlations, mucin production has been described as a common feature of CRC associated with MAP (present in around 20% of cases) and in our series we observed mucin-producing CRC tumors in only 6 of 60 (10%) probands with one of the hereditary CRC syndromes, but in two of these six patients at least one *MUTYH* allele was mutant. Another commonly described feature of MAP-associated colorectal cancer is a prominent lymphocyte infiltration. This feature was not observed in any of the colorectal cancers in our series. Finally, consanguinity, a clinical feature that is strongly suggestive of MAP in families with a recessive inheritance pattern of polyposis and CRC, was reported by

only 2 of the 60 probands with evidence of hereditary colorectal cancer. The differences observed on certain phenotypic features between our series and others described in the literature may be due to our relatively small number of MAP families or may be related to phenotypic peculiarities in this specific population.

In this report, screening of Brazilian patients with MAP and FAP phenotypes for the common germline *MUTYH* mutations p.G396D e p.Y179C followed by bidirectional sequencing of the heterozygotes was able to identify biallelic gene mutations in 4/60 (6,6%) of individuals with a hereditary CRC cancer phenotype (all syndromes included), 4/30 (13,3%) of individuals with the MAP or FAP phenotype and 3/15 (20%) individuals when only the MAP phenotype. Slightly higher mutation detection rates (20%) were observed in the subgroup of patients with the MAP phenotype. In several mutation-positive individuals there was an overlap of clinical criteria, especially between the MAP phenotype and Bethesda criteria. These findings reinforce the importance of considering *MUTYH* mutation screening not only in patients fulfilling MAP criteria but also in those with other hereditary CRC phenotypes, in particular those with associated colonic polyposis.

Additional mutation screening studies of the *MUTYH* gene and analysis of the entire coding region of the gene in a larger number of CRC cases in Brazil will be necessary to confirm these results and determine the sensitivity and specificity of *MUTYH* mutation screening in the differential diagnosis of Brazilian individuals and families at risk for hereditary colorectal cancer syndromes.

**Table 1.** Clinical description of the sample studied (n=75).

	n	%	mean	SD
<b>Sex</b>				
Female	45	60		
<b>Age at diagnosis of the first tumor (years)</b>			50.4	25.4 – 33.6
<b>Inclusion criteria</b>				
MAP	15	20		
FAP	15	20		
Lynch - Amsterdam II	15	20		
Lynch – Bethesda	15	20		
Sporadic	15	20		
Reported consanguinity (families)	2	2.7		
<b>Site of tumor (in proband)</b>				
Colon and rectum	60			
Endometrium/Ovary	3			
Presence of polyps (proband)	47			
<b>Polyp type (n=44)</b>				
Adenomatous	31			
Mixed hyperplastic adenomatous	9			
Hyperplastic	3			
Juvenile	1			
<b>Adenoma histology (n=40)</b>				
Tubular	14			
Vilous	6			
Tubulovillous	20			
<b>Number of colonic polyps in probands (n=44)</b>				
<10 polyps	21			
10-99 polyps	7			
100-500 polyps	3			
>500 polyps	2			
undetermined n° of polyps	11			
<b>Colonic polyp location</b>				
Right colon	7			
Transverse colon	4			
Recto-sigmoid	21			
Multiple sites	12			

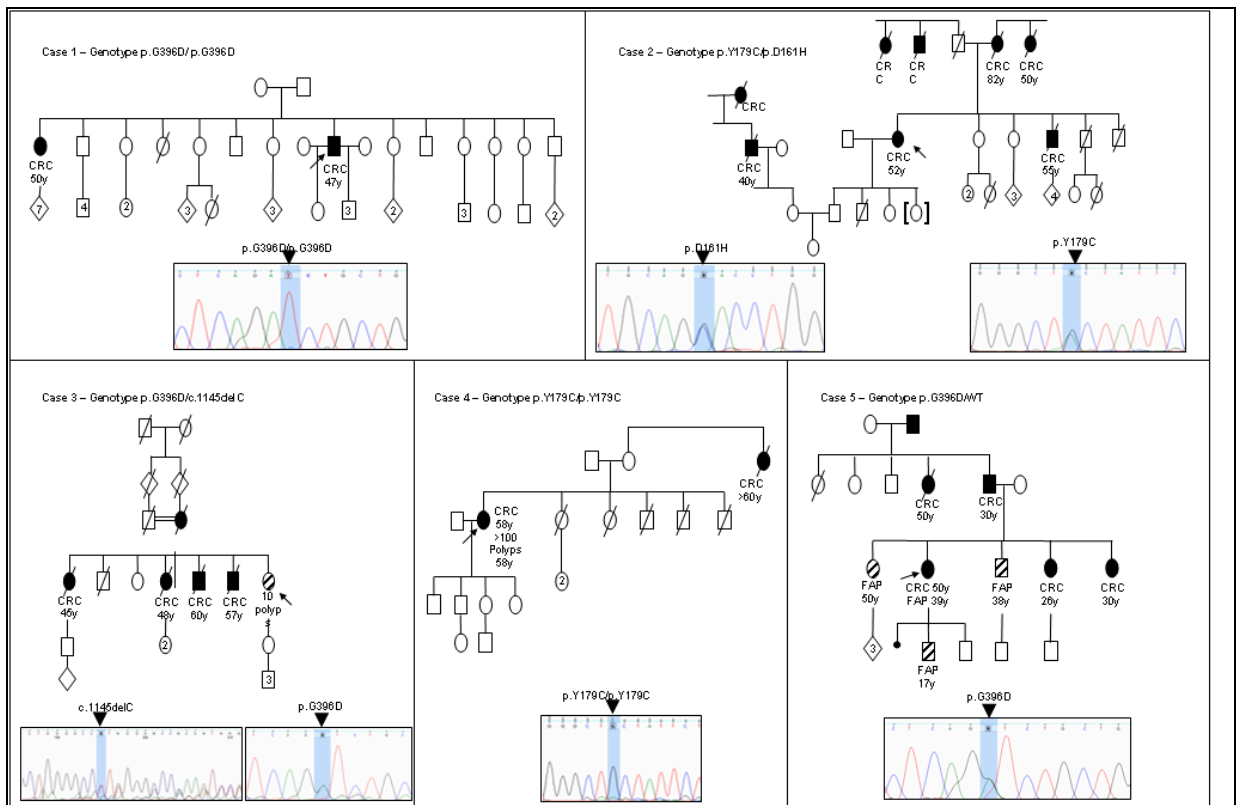
SD: standard deviation; CRC: colorectal cancer. Three patients with Amsterdam criteria presented with endometrial/ovarian cancer.



**Table 2.** Detailed description of clinical phenotype of the five *MUTYH* germline mutation carriers.

Case	Sex	Criteria	CRC dx (yrs)	<i>MUTYH</i> genotype	Number of polyps	Polyp description	Polyp location	CRC Location	CRC histology	Mucin production
1	N	MAP Bet	45	p.G396D/p.G396D	7	Tubulous and Tubulovillous	Rectum and sigmoid	Rectum	Adenoca	No
2	F	MAP	52	p.G396D/p.Asp16His	56	Tubulous	Multiple sites	Rectum	Adenoca	Yes
3	F	MAP Bet	-	p.Y179C/c.1145delC	10	Tubulovillous	Multiple sites	-	-	Unknown
4	F	FAP	58	p.Y179C/p.Y179C	> 100	Tubulous and Tubulovillous	Rectum and sigmoid	Sigmoid	Adenoca	No
5	F	FAP	26	p.G396D/WT	150	Tubulovillous	Multiple sites	Rectum	Adenoca	Yes

CRC dx (yrs); age at diagnosis of colorectal cancer.



**Figure 1.** Pedigrees and sequencing chromatograms of the five patients with germline mutations in *MUTYH* gene. The proband is indicated by and arrowhead. Solid symbols indicated cancer-affected individuals. Lined symbols indicated multiple polyps. CRC = colorectal cancer; y = years; double lines indicated consanguinity.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

We are indebted to the patients and their family members who agreed to participate in this study and to Fundação de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA). We also thank Drs. Hector Yuri Wanderley, Daniel Damin, Bernardo Garicochea and Cristina Netto for patient referrals. We are also indebted to Stefan Aretz (Institute of Human Genetics, Bonn - Germany) for sequencing protocols. We also thank Dr Rogério Margis (Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul) for technical support in Real-Time PCR. CEP, SLC and PAP received grants from CNPq and PKS received a grant from CAPES.

## REFERENCES

1. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, et al (2002) Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 30:227–232
2. David SS, O'Shea VL, Kundu S. (2007) Base-excision repair of oxidative DNA damage. *Nature* ;447(7147):941–50.
3. Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, et al (1996) Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the *Escherichia coli* mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bacteriol* 178:3885–3892
4. Vogt S, Jones N, Christian D et al., (2009) Expanded extracolonic tumor spectrum in MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology*; 137: 1976–1985.
5. Nielsen M, Franken PF, Reinards TH et al (2005) Multiplicity in polyp count and extracolonic manifestations in 40 Dutch patients with MYH associated polyposis coli (MAP). *J Med Genet* 42:e54. doi:10.1136/jmg.2005.033217
6. Wasielewski M, Out AA, Vermeulen J, et al. (2010) Increased MUTYH mutation frequency among Dutch families with breast cancer and colorectal cancer. *Breast Cancer Res Treat* [pub Feb 27]. doi:10.1007/s10549-010-0801-7
7. Cheadle JP, Sampson JR (2007) MUTYH-associated polyposis—from defect in base excision repair to clinical genetic testing. *DNA Repair (Amst)* 6:274–279. doi:10.1016/j.dnarep.2006.11.001
8. Lipton L, Tomlinson I (2006) The genetics of FAP and FAP-like syndromes. *Fam Cancer* 5:221–226. doi:10.1007/s10689-005-5673-3
9. Eliason K, Hendrickson BC, Judkins T et al (2005) The potential for increased clinical sensitivity in genetic testing for polyposis colorectal cancer through the analysis of MYH mutations in North American patients. *J Med Genet* 42:95–96. doi:10.1136/jmg.2004.025973
10. Grunhage F, Jungck M, Lamberti C et al (2008) Contribution of common monoallelic MUTYH gene variants in German patients with familial colorectal cancer. *Cancer Biomark* 4:55–61
11. Kambara T, Whitehall VL, Spring KJ et al (2004) Role of inherited defects of MYH in the development of sporadic colorectal cancer. *Genes Chromosom Cancer* 40:1–9. doi:10.1002/gcc.20011
12. Peterlongo P, Mitra N, Sanchez de Abajo A et al (2006) Increased frequency of disease-causing MYH mutations in colon cancer families. *Carcinogenesis* 27:2243–2249. doi:10.1093/carcin/bgl093
13. Stormorken AT, Hoff G, Norstein J et al (2006) MUTYH mutations do not cause HNPCC or late-onset colorectal cancer. *Hered Cancer Clin Pract* 2:90–93
14. Zhou XL, Djureinovic T, Werelius B, et al., (2005) Germline mutations in the MYH gene in Swedish familial and sporadic colorectal cancer. *Genet Test* 9:147–151. doi:10.1089/gte.2005.9.147
15. Jones S, Emmerson P, Maynard J et al. (2002) Biallelic germline mutations in MYH predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C → T:A mutations. *Hum Mol Genet* : 11 (23): 296 – 2967.
16. Sieber OM, Lipton L, Crabtree M et al. (2003) Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N Engl J Med* : 348 (9): 791–799.
17. Nielsen M, Joerink-van de Beld MC, Jones N et al. (2009) Analysis of MUTYH genotypes and colorectal phenotypes in patients with MUTYH-associated polyposis. *Gastroenterology* 136:471–476. doi:10.1053/j.gastro.2008.10.056
18. Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, et al. (2004) Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J Natl Cancer Inst.* ;96:1631–1634.
19. Wang L, Baudhuin LM, Boardman LA, et al. (2004) MYH mutations in patients with attenuated and classic polyposis and with young-onset colorectal cancer without polyps. *Gastroenterology*; 127:9–16.

20. Cleary SP, Cotterchio M, Jenkins MA, et al. (2009) Germline MutY human homologue mutations and colorectal cancer: a multisite case-control study. *Gastroenterology*;136:1251–1260.
21. Balaguer F, Castellvi-Bel S, Castells A, et al.(2007) Identification of MYH mutation carriers in colorectal cancer: a multicenter, case–control, population-based study. *Clin Gastroenterol Hepatol*;5:379–87.
22. Dunlop and Farrington. (2010) MUTYH-associated polyposis and Colorectal Cancer. *Critical reviews in oncology/hematology* vol. 18 pp. 599-610
23. Chmiel NH, Livingston AL, David SS. (2003) Insight into the functional consequences of inherited variants of the hMYH adenine glycosylase associated with colorectal cancer: complementation assays with hMYH variants and pre-steady-state kinetics of the corresponding mutated *E. coli* enzymes. *J Mol Biol*;327:431–43.
24. Fromme JC, Banerjee A, Huang SJ, Verdine GL.(2004) Structural basis for removal of adenine mispaired with 8-oxoguanine by MutY adenine DNA glycosylase. *Nature*;427:652–6.
25. D'Agostino VG, Minoprio A, Torrerri P, et al.,(2010). Functional analysis of MUTYH mutated proteins associated with familial adenomatous polyposis. *DNA Repair (Amst)* 9:700-707
26. Sampson JR, Jones S, Dolwani S, Cheadle JP, (2005) MUTYH (MYH) and colorectal cancer, *Biochem. Soc. Trans.* 33 (2005) 679–683.
27. Aceto G, Cristina Curia M, Veschi S et al. Mutations of APC and MYH in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum Mutat* 2005; 26 (4): 394.
28. Ali M, Kim H, Cleary S, et al. Characterization of mutant MUTYH proteins associated with familial colorectal cancer. *Gastroenterology* 2008;135:499–507.
29. Aretz S, Uhlhaas S, Goergens H et al. MUTYH-associated polyposis: 70 of 71 patients with biallelic mutations present with an attenuated or atypical phenotype. *Int J Cancer* 2006; 119 (4): 807–814.
30. Morak M, Laner A, Bacher U, Keiling C, Holinski-Feder E. MUTYH-associated polyposis variability of the clinical phenotype in patients with biallelic and monoallelic MUTYH mutations and report on novel mutations. *Clin Genet* 2010; 78: 353–363.
31. Ashton,K.A., Meldrum,C.J., McPhillips,M.L., Kairupan,C.F. and Scott,R.J. (2005) Frequency of the common MYH mutations (G382D and Y165C) in MMR mutation positive and negative HNPCC patients. *Hereditary Cancer Clin. Pract.*, 3, 65–70.
32. Gismondi V, Meta M, Bonelli L et al. Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer* 2004; 109 (5): 680 – 684.
33. Jo WS, Bandipalliam P, Shannon KM et al. Correlation of polyp number and family history of colon cancer with germline MYH mutations. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2005; 3 (10): 1022 – 1028.
34. Kairupan CF, Meldrum CM, Crooks R, Milward EA, Spiegelman AD, Burgess B, Groombridge C, Kirk J, Tucker K, Ward R, Williams R and Scott RJ. Mutation analysis of the MYH gene in an Australian series of colorectal polyposis patients with or without germline APC mutations. *Int J Cancer* (epub 10 Mar 2005).
35. Kim IJ, Ku JL, Kang HC, et al. Mutational analysis of OGG1, MYH, MTH1 in FAP, HNPCC and sporadic colorectal cancer patients: R154H OGG1 polymorphism is associated with sporadic colorectal cancer patients. *Hum Genet* 2004;115:498–503.
36. Parker AR, Sieber OM, Shi C, et al. Cells with pathogenic biallelic mutations in the human MUTYH gene are defective in DNA damage binding and repair. *Carcinogenesis* 2005;26: 2010 –2018.

### 13 CONSIDERAÇÕES FINAIS

De acordo com o objetivo geral deste estudo, podemos concluir que foi possível estimar a frequência das mutações comuns p.G396D e p.Y179C de *MUTYH* em pacientes com fenótipo de câncer colorretal hereditário. Não foram encontradas mutações no grupo de pacientes com fenótipo de CCR esporádico e também não no grupo de pacientes com síndrome de Lynch e critérios de Amsterdam (estes últimos espera-se que o mecanismo seja perda de função do sistema MMR). Quando foram analisados os pacientes com CCR e/ou polipose colônica (fenótipos MAP, FAP/AFAP, n = 30) identificamos 5 indivíduos portadores de pelo menos uma destas mutações (11,1%). Todos estes indivíduos apresentavam pólipos colônicos. Considerando o fenótipo “presença de pólipos colônicos” como denominador (n = 47) a prevalência das mutações comuns de *MUTYH* em pelo menos um alelo foi de 5/47 (10.6%). Como um todo, mutações bialélicas (diagnóstico molecular de MAP) foram encontradas em 4 indivíduos, todos com fenótipo MAP ou FAP. Portanto, se considerarmos esse critério fenotípico como denominador, o diagnóstico molecular pode ser feito com a estratégia de rastreamento proposta em 8,9% (4/30 casos MAP e/ou FAP) dos pacientes. As duas mutações comuns foram identificadas em homozigose em dois casos (um caso homozigoto p.G396D e um caso homozigoto p.Y179C). Dois casos apresentaram genótipo heterozigoto composto que inclui uma das duas mutações comuns e um caso apresentou mutação de *MUTYH* em apenas um alelo (heterozigoto para uma das mutações comuns) conforme evidenciado pelo seqüenciamento da região codificadora do gene .

A sobreposição fenotípica entre as síndromes de predisposição hereditária ao CCR tem sido constantemente abordada em publicações sobre a síndrome PAM, e mutações germinativas bialélicas de *MUTYH*, inicialmente associadas ao fenótipo de polipose colônica recessiva, tem mais recentemente sido descritas em indivíduos com os fenótipos de Polipose clássica e Polipose atenuada (PAF e PAFA), Síndrome de Lynch (Critério Bethesda) e síndrome de polipose hiperplásica. Esta heterogeneidade fenotípica se relaciona, em parte, com a região gênica em que se encontra a mutação. O fenótipo mais grave é observado em pacientes com o genótipo homozigoto p.Y179C, habitualmente associado a grandes quantidades de pólipos colorretais. Conforme descrito anteriormente, um dos pacientes em nossa série apresentou o genótipo p.Y179C em homozigose e um quadro clínico típico de PAF-clássica com mais de 100 pólipos colônicos, corroborando a relação genótipo/fenótipo descrita na literatura.

Outra observação importante está relacionada com a característica do tumor em produzir mucina (tumores mucinosos), fenótipo descrito em até 21% dos tumores em pacientes com a síndrome PAM. No presente estudo, 10% dos pacientes com diagnóstico

de CCR (6/60) apresentou tumores com esta característica, sendo que dois desses apresentaram pelo menos uma mutação germinativa em *MUTYH*: genótipos p.G396D/p.Asp161His e p.G396D/WT. Uma outra característica fenotípica descrita em tumores colônicos associados a mutações bialélicas de *MUTYH* é a infiltração linfocitária. Esta característica não foi observada em nossa série de casos, provavelmente devido ao baixo número de casos com mutações bialélicas. Por fim, a presença de consangüinidade, uma característica fortemente sugestiva de *MUTYH* foi relatada nas famílias de apenas 2 dos 60 probandos com evidência de CCR hereditário pela história pessoal ou familiar.

Nos portadores de mutações bialélicas comuns em homozigose identificados neste estudo (dois pacientes), o fenótipo em um caso é equivalente ao descrito na literatura para MAP (CCR e 10-99 polipose colônicos) e em outro caso, o fenótipo é de FAP clássica. Nos dois pacientes que são heterozigotos compostos, as mutações distintas de p.G396D e p.Y179C, c.1147delC e p.Asp161His, foram descritas previamente na literatura, sendo c.1145delC a terceira mutação mais frequente encontrada em populações europeias. A mutação p.Asp161His é bem menos descrita na literatura e apesar de ser considerada patogênica, a sua influência no fenótipo está pouco descrita.

Este é o primeiro estudo acerca da frequência de mutações germinativas comuns no gene *MUTYH* em famílias brasileiras com câncer colorretal. Atualmente, o diagnóstico clínico de síndromes de predisposição hereditária ao câncer colorretal é complexo e requer análise detalhada da história familiar do paciente e das características clínico-patológicas da lesão. A definição do diagnóstico etiológico em uma família, por vezes envolve diagnóstico diferencial extenso, já que pode haver uma significativa sobreposição de fenótipos. Ademais, nem sempre há um limite claro entre os diferentes critérios clínicos para as diferentes síndromes, especialmente quando se trata de pacientes com suspeita clínica de MAP, PAF e PAFA. Nesta série de casos, o rastreamento das mutações comuns de *MUTYH* p.G396D e p.Y179C seguida de sequenciamento dos casos que apresentam um dos alelos acometidos apenas, parece ser uma estratégia inicial interessante de investigação molecular de famílias com critérios para as síndromes MAP e FAP. Com essa abordagem, foram identificados 4 portadores de mutações bialélicas em um grupo de 30 pacientes com estes critérios. A maior eficiência diagnóstica foi observada no grupo MAP, como esperado, com identificação de 3 portadores de mutações bialélicas em um grupo total de 15 pacientes. Estudos adicionais de rastreamento de mutações no gene *MUTYH*, e análise de toda a sequência codificadora do gene em séries maiores de casos, poderão complementar esta estimativa e definir a validade e aplicabilidade do rastreamento destas mutações como abordagem para diagnóstico diferencial nos indivíduos e famílias com predisposição hereditária ao câncer colorretal e com fenótipo de oligopolipose colônica atenuada (10-99 pólipos)

## **ANEXOS**

### ***Anexo 1 - Critérios Clínicos de Amsterdam***

#### Critérios de Amsterdam (I)

Pelo menos 3 membros da família afetados por CCR:

- Um dos afetados deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.
- Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
- Pelo menos um tumor deve ser diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
- O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar deve ser excluído.
- Os tumores devem ser verificados através de exame histopatológico.

#### Critérios de Amsterdam modificados (II)

Pelo menos 3 membros da família afetados por CCR ou tumor associado a S. Lynch: câncer de endométrio, intestino delgado, ureter ou pélvis renal.

- Um dos afetados deve ser parente em primeiro grau dos outros dois.
- Pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas.
- Pelo menos um tumor deve ser diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
- O diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar deve ser excluído.
- Os tumores devem ser verificados através de exame histopatológico.

## **Anexo 2 – Critérios Clínicos de Bethesda**

### Critérios Bethesda

- a) Indivíduos com dois tumores do espectro Lynch incluindo: CCR sincrônico ou metacrônico, ou câncer extracolônico (endométrio, intestino delgado, de células transicionais de pélvis renal ou ureter).
- b) Indivíduos com CCR e um parente em primeiro grau com CCR e/ou câncer extracolônico do espectro Lynch e/ou adenoma colorretal; um dos casos de câncer diagnosticado antes dos 45 anos de idade, e o adenoma diagnosticado antes dos 40 anos de idade.
- c) Indivíduos com CCR ou CE diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- d) Indivíduos com CCR no cólon direito com padrão histopatológico indiferenciado diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- e) Indivíduos com CCR e tipo celular em anéis de sinete, diagnosticado antes dos 45 anos de idade.
- f) Indivíduos com adenoma diagnosticados antes dos 45 anos de idade.

### Critérios Bethesda modificados

- a) Indivíduos com diagnóstico de CCR antes dos 50 anos de idade.
- b) Presença de tumores sincrônicos ou metacrônicos colorretais ou do espectro Lynch (endométrio, estômago, ovários, pâncreas, ureter, pélvis renal, trato biliar, tumores cerebrais, adenomas das glândulas sebáceas, ceratoacantomas da Síndrome Muir-Torre e carcinoma do intestino delgado), independente da idade ao diagnóstico.
- c) Indivíduos com CCR com histologia MSI-H diagnosticado antes dos 60 anos de idade.
- d) Indivíduos com CCR com um ou mais parentes em primeiro grau com tumor do espectro Lynch, sendo um dos casos diagnosticado antes dos 50 anos de idade.
- e) Indivíduos com CCR e dois ou mais parentes em primeiro ou segundo grau com tumor do espectro Lynch, independente da idade.



### **Anexo 3: TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

#### Termo de consentimento livre e esclarecido

PROJETO DE PESQUISA: “Análise de mutações no gene MYH em indivíduos em risco para polipose associada ao MYH”.

Pesquisadores: Carlos Eduardo Pitroski, Silvia Liliana Cossio, Hector Yuri Conti Wanderley, Patrícia Koehler-Santos, Márcia Graudenz, João Carlos Prolla, Patrícia Ashton-Prolla

Telefone para contato com os pesquisadores: Lab. de Medicina Genômica (HCPA): (51) 2101-7661

#### OBJETIVO:

Você está sendo convidado para participar de um projeto de pesquisa que vai estudar a prevalência de alterações genéticas em um gene chamado MYH em uma amostra de sangue periférico a ser coletada no momento da consulta. Quando estas alterações estão presentes, elas indicam que a pessoa tem uma tendência a desenvolver pólipos e/ou tumores de intestino, e que deve ser portador da chamada Síndrome da Polipose Associada ao MYH (PAM). Este tipo de alteração já foi identificado em pacientes com a síndrome PAM em outros países e nosso objetivo é verificar se também ocorrem aqui em pacientes que têm polipose do intestino, associada ou não a tumores de intestino, e algumas características especiais da história familiar. Estão sendo selecionadas para este estudo pessoas portadoras de 15 a 99 pólipos colorretais e/ou câncer colorretal antes dos 50 anos de idade associado a 2 ou mais pólipos e/ou câncer colorretal com características especiais na história da família; também poderão ser incluídos indivíduos que participam de outro projeto de pesquisa nesse hospital e que tenham expressão alterada da proteína do gene MYH identificada por um exame chamado imuno-histoquímica. A princípio, esperamos encontrar alterações no gene MYH em um certo número de pacientes. A identificação desta alteração poderá indicar a causa da sua história pessoal e/ou familiar de pólipos e/ou câncer de intestino e poderá auxiliar na identificação precoce de outros familiares de risco que podem se beneficiar de exames preventivos.

#### PROCEDIMENTOS QUE SERÃO UTILIZADOS:

O estudo envolve pelo menos duas consultas médicas, a primeira constando da explicação deste projeto de pesquisa com leitura e assinatura do termo de consentimento, que no caso de pacientes menores de 18 anos deve ser assinado pelo seu responsável legal, revisão da sua história médica pessoal e familiar, e aconselhamento genético (AG). Uma segunda consulta será realizada após o término das avaliações, quando serão fornecidos os resultados da análise de alterações genéticas no gene MYH, seguida de aconselhamento genético pós-teste e fornecimento de laudo por escrito com o resultado, bem como recomendações médicas para o indivíduo testado e sua família realizarem o acompanhamento necessário com o seu médico assistente de origem. Em casos especiais ou emergenciais os familiares (assim como os casos-índice) poderão ser atendidos fora do cronograma da pesquisa pela própria equipe.

A sua participação nesse estudo é voluntária e não vai influenciar ou modificar seu acesso a tratamento médico agora ou no futuro. Como esse é um projeto de pesquisa e o exame não será realizado em um laboratório comercial, não há prazo exato nem garantia absoluta de resultado conclusivo. Você tem a opção de não querer receber ou retardar o recebimento dos resultados da análise molecular durante qualquer momento do processo de testagem.

Se você quiser saber qual é o resultado, este será fornecido, preferencialmente a você, durante uma sessão pessoal de aconselhamento genético no Ambulatório de Genética do Câncer do Hospital de Clínicas. A princípio, esse aconselhamento é realizado individualmente, mas você poderá trazer um familiar ou outra pessoa para acompanhar a consulta. O resultado não será transmitido por telefone, fax ou carta. Em casos especiais, se você estiver impossibilitado de comparecer pessoalmente para receber o resultado, poderá indicar uma pessoa para fazê-lo em seu nome.

#### BENEFÍCIOS QUE PODERÃO SER OBTIDOS:

Com este estudo esperamos padronizar uma técnica de rastreamento de alterações genéticas no gene MYH, associado à síndromes hereditárias. A realização do teste possibilita identificar pessoas em risco e encaminhá-las para programas mais intensivos de prevenção da ocorrência de novos tumores.

#### POTENCIAIS RISCOS DA PARTICIPAÇÃO NA PESQUISA:

Para realizar o teste genético será coletada uma pequena amostra de seu sangue (10 ml) em dois frascos. As amostras serão analisadas no Centro de Pesquisas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Laboratório de Medicina Genômica). No momento da coleta de sangue poderá haver alguma dor em decorrência da punção da pele. Complicações de coleta de sangue são raras e geralmente são de pequeno porte. Se houver extravasamento de sangue da veia no local da punção geralmente há uma mancha roxa (hematoma) e um pequeno desconforto que desaparece em poucos dias. As coletas de sangue serão realizadas por profissionais especialmente treinados para este fim o que diminui as chances de complicações.

#### DOCUMENTAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa e ao tratamento e que serei informado quanto ao desenvolvimento de novos exames relacionados.

SIM

NÃO

2. Declaro estar ciente de meu direito de retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isso traga prejuízo a continuidade de meu tratamento.

SIM

NÃO

3. Declaro ter sido esclarecido que não receberei nenhum tipo de remuneração financeira.

SIM

NÃO

4. Declaro ter sido esclarecido sobre a segurança de que minha identidade será preservada e que todas as informações por mim fornecidas serão confidenciais.

SIM

NÃO

5. Declaro estar ciente de que poderei optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

SIM

NÃO

6. Concordo em que meu material genético (DNA) seja armazenado no Laboratório de Medicina Genômica do HCPA após término deste estudo. Nesse caso entendo que se for utilizado em nova pesquisa, serei contactado previamente e o material somente será utilizado se autorizado por mim e mediante nova assinatura de Termo de Consentimento.

SIM

NÃO

7. O resultado desta pesquisa será entregue preferencialmente a você em uma consulta. Caso você esteja impossibilitado de receber o resultado pessoalmente, autoriza outra pessoa a receber o resultado em seu nome?

SIM

NÃO

Em caso afirmativo indique nome e telefone desta pessoa:

\_\_\_\_\_

8. Consentimento:

Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos e procedimentos necessários para este teste molecular e os possíveis riscos e benefícios na minha melhor capacidade.

\_\_\_\_\_

Assinatura

\_\_\_\_\_

Nome por extenso

\_\_\_\_\_

Data

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu concordo em realizar a análise molecular e aceito os riscos. Eu entendo a informação fornecida por este documento e eu tive a oportunidade de fazer perguntas e esclarecer dúvidas que eu tinha sobre o teste, o procedimento, os riscos associados e as alternativas.

\_\_\_\_\_

Participante

Data de nascimento

\_\_\_\_\_

Data

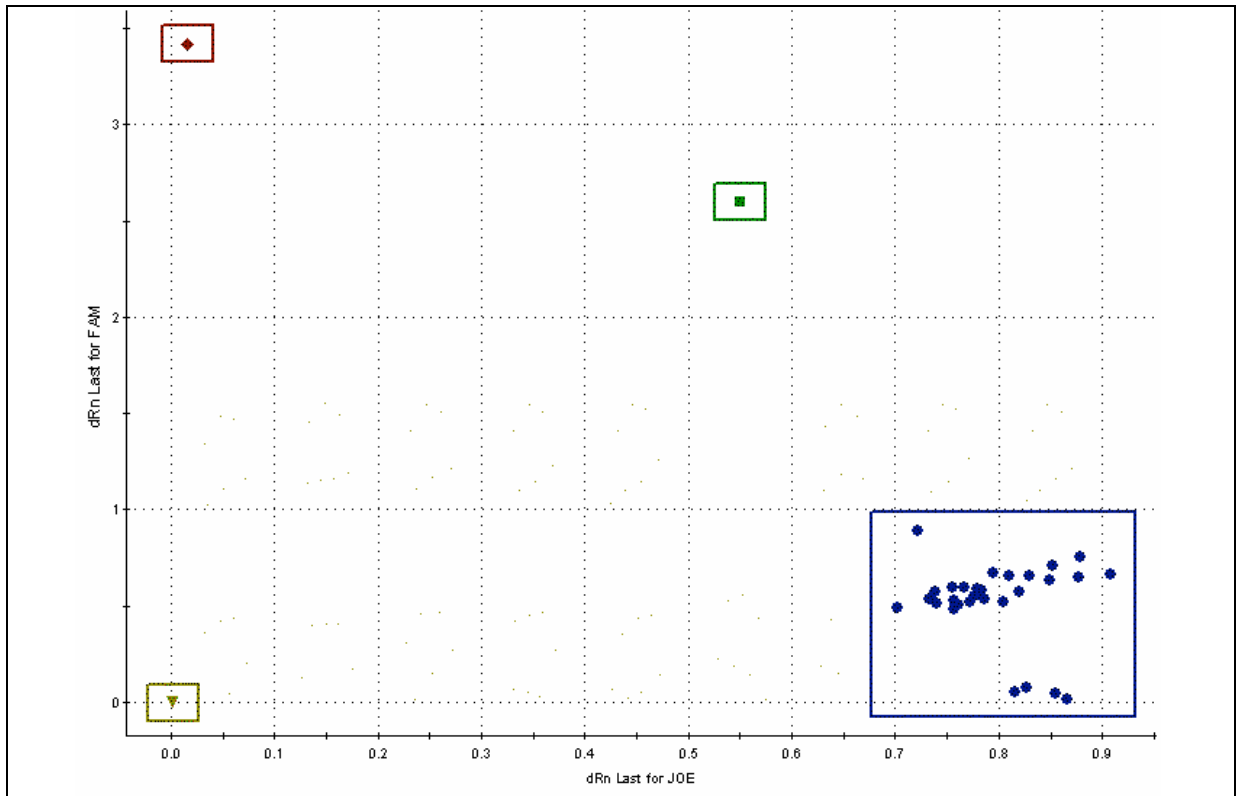
\_\_\_\_\_

Testemunha

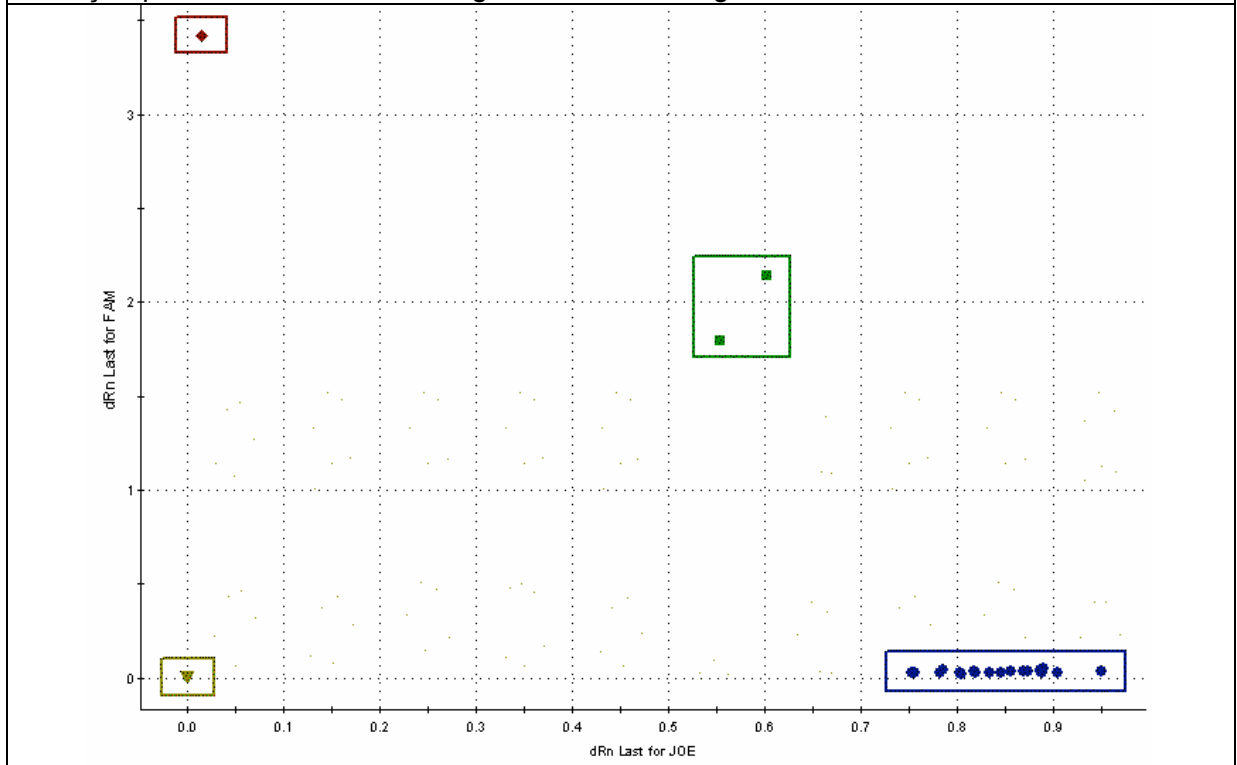
\_\_\_\_\_

Data

#### Anexo 4. Gráficos de Discriminação Alélica



**Figura 7.** Resultado da análise do ensaio TaqMan para identificação da mutação p.Y179C utilizando o software MxPro QPCR Software Stratagene. Vermelho: homocigoto para a mutação p.Y179C; Verde: heterocigoto; Azul: homocigoto normal.



**Figura 8.** Resultado da análise do ensaio TaqMan para identificação da mutação p.G396D utilizando o software MxPro QPCR Software Stratagene. Vermelho: homocigoto para a mutação p.G396D; Verde: heterocigoto; Azul: homocigoto normal.

## Anexo 5. Protocolos Reação em Cadeia da Polimerase - PCR

### Protocolos PCR's - Exon 1

Primers - 1F e 1R [20pmol]

Termociclador: ABI ou TECHNE

Programa - MUTYH 62C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

20 seg      62°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	12uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
1-F	ACTATGAGCCCGAGGCCTTC	250

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
-----------------	---------------	-----------------------------------

1-R            AAGTTCGACCCATCGGCGAC

---

## Protocolos PCR's - Exon 2

Primers - 2F e 2R [20pmol]

Termociclador: ABI ou TECHNE

Programa - MUTYH 62C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

20 seg 62°C

1 min	72°C
-------	------

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	12uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
2-F	AGCTATCACCTTGAAGGC	280
2-R	GTCTTGATACGTATCACAATCC	

### Protocolos PCR's - Exon 3

Primers - 3F e 3R [20pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 62C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      64°C

1 min	72°C
-------	------

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
3-F	CATACTGCCACAGGCTGCTG	310
3-R	CAGATGAGGAGTTAGGGTGG	



### Protocolos PCR's - Exons 4 e 5

Primers - 4F e 5R [20pmol]

Termociclador: ABI ou TECHNE

Programa - MUTYH 63°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      64°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
4-F	CATGGAGAAGACGGGTAGGC	400
5-R	TACACCCACCCCAAAGTAGA	

## Protocolos PCR's - Exons 6 e 7

Primers - 6F e 7R [20pmol]

Termociclador: ABI ou TECHNE

Programa - MUTYH 59°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

45 seg      59°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	1.2 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
6-F	TACTTTGGGGTGGGTGTAGA	360
7-R	CCTGATTGGAGTGCAAGACTC	

### Protocolos PCR's - Exons 8 e 9

Primers - 8F e 9R [10pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 62.5°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

45 seg      62.5°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	1uL	0.5% [10%]
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	0,8uL	2mM [50mM]
dNTP	0,8uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	0,8uL	0.4 pmol [10pmol]
Primer Reverse	0,8uL	0.4 pmol [10pmol]
Taq DNA Polimerase	0.16uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
8-F	CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT	420
9-R	GAAGGGAACACTGCTGTGAAG	

## Protocolos PCR's - Exons 10 e 11

Primers - 10F e 11R [20pmol]

Termociclador: ABI ou TECHNE

Programa - MUTYH 62.5°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      62.5°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1uL	1 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1uL	1 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
10-F	CTTCAGGGGTGTCTGCAAAGG	410
11-R	AGAATCTTACTCAGGTTAGAGG	

## Protocolos PCR's - Exons 12

Primers - 12F e 12R [20pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 57.5°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      57.5°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1uL	1 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1uL	1 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
12-F	CAAAGCCCACTCTCTAGGTTG	325
12-R	TGCCGATTCCCTCCATTCT	

## Protocolos PCR's - Exons 13 e 14

Primers - 13F e 14R [20pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 65°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      65°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	0,8uL	0,8 pmol [20pmol]
Primer Reverse	0,8uL	0,8 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
13-F	AGAGAATGGAGGGAATCGGC	480
14-R	CATGTAGGAAACACAAGGAAGTA	

## Protocolos PCR's - Exons 15

Primers - 15F e 15R [20pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 60°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      60°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	0,8 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	0,8 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

<b>Nome do Primer</b>	<b>Seqüência primer</b>	<b>Tamanho (bp)</b>
15-F	TGAAGTTAAGGGCAGAACACC	205
15-R	GTTACCCAGACATTCGTTAGT	

## Protocolos PCR's - Exons 16

Primers - 16F e 16R [20pmol]  
 Termociclador: ABI ou TECHNE  
 Programa - MUTYH 58°C

<i>Tempo</i>	<i>Temperatura</i>	
5 min	94°C	
30 seg	94°C	

---

20 seg      58°C

1 min	72°C	
-------	------	--

20 min	72°C	
Hold	23°C	

<i>Reagente</i>	<i>Volume</i>	<i>Concentração [estoque]</i>
H <sub>2</sub> O	p/ completar vol. total 20uL	
DMSO	-	
Buffer	2uL	1x [10x]
MgCl <sub>2</sub>	1,2uL	3mM [50mM]
dNTP	1,2uL	0.6mM [10mM]
Primer Forward	1,2uL	0,8 pmol [20pmol]
Primer Reverse	1,2uL	0,8 pmol [20pmol]
Taq DNA Polimerase	0.2uL	1u [5u/uL]

Nome do Primer	Seqüência primer	Tamanho (bp)
16-F	AAGGAGAGGATTCTCTGCTCC	240
16-R	CTAACAAACAGGATTCTCAGGG	



