

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**ANÁLISE DO GENE *MSH6* EM PACIENTES  
COM SÍNDROME DE LYNCH**

**Nayê Balzan Schneider**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Genética e Biologia Molecular.

**Orientadora: Patricia Ashton-Prolla**

**Porto Alegre**

**Março de 2015**

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Medicina Genômica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, financiado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pelo Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos (FIPE).

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pela formação gratuita e de qualidade proporcionada.

À Patricia Prolla, minha orientadora, por ter aberto as portas do Laboratório para o estágio durante a graduação de Biologia e pelo convite para o mestrado. Foram dois anos de muita aprendizagem e crescimento. Obrigada por todas as oportunidades.

A todos os amigos do LMG, pelos ensinamentos de laboratório, pela disposição em ajudar, pelo bom convívio diário e principalmente pela amizade, com vocês foi sempre bom ir trabalhar.

À Lili Cossio e Patrícia Koehler, pelo auxílio sempre que necessário para realização deste trabalho.

Ao Elmo e ao Everaldo, por toda a ajuda e disponibilidade, por serem exemplos de profissionais e no relacionamento com as pessoas.

À minha família, por sempre me passar força, acreditar na minha capacidade e apoiar minhas escolhas. A segurança e o amor de vocês são fundamentais pra tudo.

Ao Álvaro, pelo companheirismo, atenção e carinho, ao teu lado toda correria desse período foi bem mais tranquila.

## SUMÁRIO

CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO .....	22
1.1 Câncer colorretal.....	23
1.2 A Síndrome de Lynch.....	24
1.2.1 Histórico da Síndrome de Lynch .....	24
1.2.2 Características clínicas da Síndrome de Lynch .....	25
1.2.3 Características moleculares da Síndrome de Lynch .....	28
1.3 Técnicas para rastreamento da Síndrome de Lynch .....	29
1.4 A Síndrome de Lynch no Brasil .....	30
1.5 O sistema MMR de reparo do DNA.....	31
1.6 O gene <i>MSH6</i> .....	34
1.6.1 <i>MSH6</i> na Síndrome de Lynch.....	36
CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA .....	39
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS .....	41
3.1 Objetivo Geral .....	42
3.2 Objetivos Específicos .....	42
CAPÍTULO 4. <i>MSH6</i> mutation prevalence among patients with suspected Lynch syndrome in Brazil .....	43
CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	58

## LISTA DE ABREVIATURAS

BDGP: *Berkeley Drosophila Genome Project*

CCR: Câncer Colorretal

CE: Câncer de endométrio

CMMR-D: *Constitutional mismatch repair deficiency*

FCCTX: Câncer Colorretal Familiar Tipo X

H3K36m3: *Trimethylation of histone H3 lysine 36*

HGMD: *Human Gene Mutation Database*

HNPCC: *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer*

HOPE: *Have Your Protein Explained*

IDL: Inserções e deleções

IHQ: Imunohistoquímica

IMS: Instabilidade de microssatélites

InSIGHT: *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours Incorporated*

LOVD: *Leiden Open Variation Database*

MLPA: *Multiplex Dependent-ligation probe amplification*

MMR: *Mismatch repair*

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

NF-1: Neurofibromatose tipo 1

PAF: Polipose adenomatosa familiar

PAM: Polipose Associada ao gene MUTYH

Panther: *Protein analysis through evolutionary relationships*

pb: Par de base

PIP: *PCNA Intereaction Protein*

PolyPhen: *Polymorphism Phenotyping*

RCV: Risco cumulativo vital

SDM: *Site Directed Mutator*

SIFT: *Sorting Intolerant from Tolerant*

VUS: *Variant of uncertain significance*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Proporção de indivíduos com mutações nos genes MMR.....	29
<b>Figura 2:</b> Complexo MutSa.....	33
<b>Figura 3:</b> Ilustração esquemática do sistema de reparo MMR.....	34
<b>Figura 4:</b> Distribuição dos éxons e íntrons no gene <i>MSH6</i> .....	35
<b>Figura 5:</b> Representação da região N-terminal e da organização dos domínios de ligação de <i>MSH6</i> à MutS.....	35
<b>Figura 6:</b> Alterações encontradas em <i>MSH6</i> .....	36

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1:** Risco cumulativo vital de câncer em pacientes com Síndrome de Lynch e na população geral.....25

**Tabela 2:** Comparação de características da Síndrome de Lynch conforme o gene mutado.....37

**Tabela 3:** Proporções de mutações dos genes MMR, entre probandos com mutações identificadas em diferentes estudos com câncer colorretal e câncer de endométrio.....38

## RESUMO

Entre as síndromes hereditárias de predisposição ao câncer colorretal a Síndrome de Lynch é a síndrome mais frequente, sendo causada por mutações germinativas em um dos principais genes envolvidos na via de reparo de mau pareamento do DNA (MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Clinicamente, a identificação da síndrome é feita pelos critérios de Amsterdam e Bethesda. Uma de suas características é a idade precoce no diagnóstico de câncer colorretal (~45 anos) assim como de tumores extracolônicos do espectro Lynch. Os genes *MLH1* e *MSH2* são os mais frequentemente mutados e são associados ao fenótipo clássico da síndrome, enquanto mutações em *MSH6* e *PMS2* são associadas a um fenótipo atípico. Mutações em *MSH6* ocorrem em cerca de 10% dos pacientes, com consideráveis diferenças na frequência entre diferentes populações, e são descritas em famílias com idade mais tardia de aparecimento do câncer colorretal, ocorrência de câncer de endométrio e baixa IMS no tecido tumoral. O objetivo desse trabalho é identificar mutações germinativas pontuais e rearranjos no gene *MSH6* em pacientes brasileiros com diagnóstico clínico de Síndrome de Lynch. Para identificação das mutações foram analisadas: a sequência codificadora e as junções éxon-íntron do gene, por PCR seguido de sequenciamento; assim como a presença de rearranjos pela técnica Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). A imunohistoquímica (IHQ) e IMS também foram avaliadas. As amostras de sangue periférico foram coletadas, após a obtenção do consentimento informado, de 68 pacientes com critérios clínicos para a Síndrome de Lynch, 40 pacientes foram classificados pelos critérios de Bethesda e 28 pelos critérios de Amsterdam. Vinte e seis alterações em *MSH6* foram identificadas pelo sequenciamento: seis pequenas deleções (todas em regiões intrônicas) e vinte trocas únicas de nucleotídeos (sete sinônimas, cinco não sinônimas e as demais intrônicas). Três das variantes não sinônimas (c.2006T>C (encontrada em um paciente); c.3772C>G (encontrada em um paciente); c.719 G>A (encontrada em dois pacientes)) não estão classificadas quanto a patogenicidade nos bancos de dados pesquisados: HGMD, NCBI e LOVD. Essas variantes foram analisadas por preditores *in silico* e os resultados sugerem que duas delas, c.2006T>C e c.3772C>G, são patogênicas. Não foram detectados rearranjos em *MSH6* pelo MLPA. A IHQ mostrou perda da expressão nuclear de *MSH6* no tecido tumoral de 22 pacientes (32%), e foi observada alta IMS em 19 (61%) pacientes. Apesar de não terem sido encontradas mutações patogênicas em *MSH6*, a análise de IHQ mostrou que a proteína *MSH6* está ausente em uma porção considerável da amostra, o



que indica que outros genes ou outros processos devem estar interferindo na expressão de MSH6. A análise adicional de sequência *MSH2* feita por outro grupo, com os mesmos pacientes, detectou oito mutações patogênicas que podem explicar 36% da perda da expressão de MSH6. Estes dados sugerem que o sequenciamento apenas de *MSH6* em casos de perda de expressão MSH6 não é suficiente para identificar a causa dos resultados de IHQ. Outros estudos que analisaram a sequência de *MSH6* indicam que a prevalência de mutações neste gene parece ser muito diversificada. Apesar do pequeno tamanho amostral deste trabalho, os dados sugerem que no Brasil este gene parece ser responsável por uma porcentagem pequena dos pacientes com Síndrome de Lynch.

## ABSTRACT

Lynch syndrome is the most common inherited colorectal syndrome, caused by germline mutations in one of the major genes involved in mismatch repair (MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*. Clinically, the family identification of Lynch Syndrome is delineated by Amsterdam or Bethesda criteria. The syndrome is characterized by early onset (~45 years) of colorectal cancer, as well as extra-colonic cancer. *MLH1* and *MSH2* are the genes most commonly mutated in Lynch syndrome. Mutations in these genes are associated with a classical phenotype, whereas mutations in *MSH6* and *PMS2* are more frequently associated with an atypical phenotype. The mutations affect *MSH6* in about 10% of the patients, with considerable differences between populations, and have been described in families with the frequent occurrence of late onset colorectal cancer, occurrence of endometrial cancer and low degree microsatellite instability (MSI) in tumor tissue. In this study we analyzed the coding sequence and intron-exon boundaries of *MSH6* gene by PCR followed by direct sequencing; as well as the presence of rearrangements through Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) to identify *MSH6* mutations. Immunohistochemistry (IHQ) and IMS of the tumors also were evaluated. Peripheral blood samples were obtained after informed consent from 68 patients with Lynch Syndrome patients, clinically classified as Bethesda (n=40) and Amsterdam (n=28). A total of twenty-six *MSH6* sequence alterations were identified by sequencing: six small deletions (all in intronic regions) and twenty single nucleotide variation (seven synonymous and five non synonymous). Three of these variants (c.2006T>C (found in one patient); c.3772C>G (found in one patient); c.719 G>A (found in two patients)) are not classified in the databases researched: HGMD, NCBI and LOVD. These variants were analyzed by *in silico* predictors and the result suggest that two of them, c.2006T>C and c.3772C>G, are possibly pathogenic. No rearrangements were detected in *MSH6* by MLPA. IHQ shows nuclear absence of MSH6 protein in tumor tissue of 22 patients (32%), and IMS was observed in 19 (61%) patients. Despite the absence of mutations, IHQ analysis showed that the MSH6 protein is absent in a considerable portion of the samples, which indicates that other genes or other processes must be interfering in the MSH6 protein expression. Additional analysis of *MSH2* sequence by other group, with the same patients, detected eight pathogenic mutations that can explain 36% of loss in MSH6 protein. These results suggest that sequencing of only *MSH6* in cases of loss of MSH6 expression is not sufficient to identify the cause of the IHQ result. Others studies that analyze the *MSH6* gene

indicate that the prevalence of mutations in this gene seems to be much diversified, despite the small sample size, this results suggests that *MSH6* appears to be responsible for a small percentage of Lynch syndrome cases in this population.

## **CAPÍTULO 1. INTRODUÇÃO**

## 1.1 Câncer colorretal

O Câncer colorretal (CCR) é uma doença que atinge indistintamente homens e mulheres, no Brasil, é o terceiro tipo de câncer mais incidente entre os homens, e o segundo entre as mulheres. Na região Sul estima-se que a incidência de CCR em 2014 considerando os dois gêneros seja de cerca de 5.000 casos. Apesar da alta incidência, considera-se de bom prognóstico se for diagnosticado em estágios iniciais, sendo que a sobrevida média global em cinco anos se encontra em torno de 55% nos países desenvolvidos e 40% nos países em desenvolvimento (INCa, 2014).

Os fatores etiológicos e os mecanismos genéticos que levam ao desenvolvimento do CCR são complexos e heterogêneos. Sabe-se que entre os agentes que contribuem nesse processo estão a dieta e o estilo de vida (dietas ricas em gorduras insaturadas, carnes vermelhas e consumo excessivo de álcool), assim como fatores genéticos e mutações somáticas (Huxley, 2009). Do ponto de vista etiológico, essa neoplasia pode ser classificada em três tipos distintos: esporádico, familiar e hereditário. A caracterização de cada um deles, nem sempre é clara, uma vez que a história familiar e as informações genéticas dos indivíduos disponíveis muitas vezes não são suficientes para fornecer as informações necessárias para esta diferenciação.

A forma esporádica da doença não apresenta um componente hereditário evidente, representa cerca de 70% dos casos de CCR, e é comum em pessoas com mais de 60 anos de idade. Nestes casos, os danos ao DNA são geralmente causados pela interação com o ambiente (exposição a substâncias carcinogênicas, hábitos alimentares, radiações e nicotina) ou pelos efeitos da idade, resultando no favorecimento de uma instabilidade genética. Geralmente o câncer aparece quando o ambiente adverso contribui para esta instabilidade por um período suficientemente longo para permitir o acúmulo de um número crítico de alterações genéticas. O CCR resulta do acúmulo de múltiplas mutações somáticas em uma célula, sendo que essas mutações podem levar a alterações que desenvolvem uma nova função ou um ganho de função em oncogenes, ou ainda, podem causar a perda de função em genes supressores de tumor (Fearon, 2011).

Quanto à forma familiar, que representa cerca de 20% dos casos de CCR, é identificada em um contexto de história familiar, por observarem-se vários casos de câncer em que os fatores genéticos não são claros. As famílias apresentam uma história de CCR que

sugere o envolvimento de fatores hereditários ou exposição comum a fatores de risco (Schlussel, 2014).

O CCR hereditário decorre principalmente da existência de uma mutação germinativa em um gene de predisposição ao câncer, assim, os portadores herdam de um ou ambos os pais uma mutação deletéria. O diagnóstico de uma síndrome hereditária de CCR é feito em cerca de 10% de todos os diagnósticos de CCR, entre elas destacam-se a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), a Polipose Associada ao gene MUTYH (PAM), e a Síndrome de Lynch, sendo esta última a mais frequente (Schlussel, 2014). Dentre essas três síndromes, a Síndrome de Lynch é a única não associada a pólipos, um importante precursor de CCR. Os pólipos adenomatosos formam-se a partir do epitélio glandular e os que possuem tamanho maior a um centímetro representam um alto risco de desenvolvimento de CCR se não forem removidos (Zauber, 2012).

Entender o modo de herança do CCR é importante para identificar indivíduos em risco, possibilitando um acompanhamento adequado, um melhor diagnóstico e tratamento mais apropriado (Samadder, 2014).

## **1.2 A Síndrome de Lynch**

### **1.2.1 Histórico da Síndrome de Lynch**

A Síndrome de Lynch, também conhecida como Síndrome de Câncer Colorretal Hereditário Sem Polipose (*Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer – HNPCC*), começou a ser identificada em 1895 por Aldred Scott Warthin, ao estudar uma família com vários casos de morte por câncer gástrico, uterino e de cólon. Em 1913 Warthin publicou o heredograma da família, com 10 membros afetados, a partir do qual observou uma predisposição familiar ao câncer. A ‘Família G’, como ficou conhecida, foi amplamente estudada e a partir dela foi possível identificar mais famílias com fenótipos similares (Boland & Lynch, 2013).

Em 1966 Henry Lynch descreveu duas famílias com história semelhante à Família G, com várias gerações de indivíduos afetados com câncer gástrico, de endométrio e de cólon. Sua publicação envolvendo 650 membros da Família G fortaleceu as evidências que caracterizaram a doença como uma herança autossômica dominante, com idade precoce de início (antes dos 45 anos de idade) e ocorrência de adenocarcinomas de cólon, endométrio e estômago (Sehgal, 2014).

Em 1985 Lynch começou a usar o termo *Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* para denominar a doença, o termo ainda é usado, mas quando as bases genéticas da doença foram descobertas e com o reconhecimento de que nem todas as famílias com CCR apresentam a mesma doença, o termo Síndrome de Lynch, passou a ser usado para denominar as famílias que apresentam mutações nos genes da via de reparo *Mismatch Repair* (MMR) (Boland & Lynch, 2013).

### 1.2.2 Características clínicas da Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch representa 1-7% dos casos de câncer colorretal (CCR), e cerca de 50% dos casos de CCR hereditário (Lynch e cols., 1993). É uma síndrome com transmissão autossômica dominante de alta penetrância, que tem como característica a alta instabilidade de microssatélites e o risco elevado de aparecimento de tumores colorretais e de tumores extracolônicos, como endométrio, ovário, estômago, intestino delgado e trato urinário, em pacientes portadores de mutação (Tabela 1). Embora ainda não associados à Síndrome de Lynch, alguns estudos relatam aumento no risco dos pacientes desenvolverem câncer de pâncreas, mama e próstata (Kastrinos, 2009; Engel, 2012).

**Tabela 1: Risco cumulativo vital de câncer em pacientes com Síndrome de Lynch e na população geral.** Modificada de Bonis e cols., 2007.

<b>Tumor</b>	<b>Síndrome de Lynch (%)</b>	<b>População (%)</b>
Colorretal	80-82	5-6
Endométrio	50-60	2-3
Gástrico	13	1
Ovário	12	1-2
Intestino delgado	1-4	0,01
Bexiga	4	1-3
Cerebral	4	0,6
Trato biliar	2	0,5

Todos os cânceres relacionados à síndrome são caracterizados pela idade precoce de início (média de 45 anos). Ao contrário de outras síndromes associadas ao câncer colorretal, a

presença de pólipos não é comum, e quando ocorre, são pólipos pequenos e em baixo número (<10) (Lynch e cols., 1993).

Os critérios de diagnóstico clínico para identificação de indivíduos com a Síndrome de Lynch foram primeiramente definidos em 1990, pelo *International Collaborative Group on HNPCC* (atualmente denominado *International Society of Gastrointestinal Hereditary Tumours*), onde foram definidos os critérios de Amsterdam. Os critérios de Amsterdam I foram estabelecidos como: a) pelo menos três indivíduos na mesma família com CCR, b) um indivíduo deve ser parente de primeiro grau dos outros dois, c) pelo menos duas gerações sucessivas devem ser afetadas, d) pelo menos um indivíduo deve ser diagnosticado antes dos 50 anos e e) deve ser excluído o diagnóstico de Polipose Adenomatosa Familiar (PAF) (Vasen e cols., 1991). Em 1999 os critérios de Amsterdam I foram reformulados para inclusão dos tumores extracolônicos relacionados à Síndrome, e denominados de Critérios de Amsterdam Revisados ou Amsterdam II (Vasen e cols., 1999) (Quadro 1).

#### **Quadro 1: Critérios clínicos de Amsterdam I e Amsterdam II.**

##### **AMSTERDAM I (Vasen e cols., 1991)**

Todos os critérios devem ser preenchidos:

1. Pelo menos três casos de CCR em que 2 dos indivíduos afetados são parentes em 1º grau do terceiro;
2. Casos de CCR em no mínimo 2 gerações;
3. Pelo menos 1 caso de CCR < 50 anos de idade;
4. Exclusão do diagnóstico de PAF.

##### **AMSTERDAM II (Vasen e cols., 1999)**

Todos os critérios devem ser preenchidos:

1. Pelo menos três familiares com neoplasia associada à Síndrome de Lynch (tumores de endométrio, estômago, intestino delgado, hepatobiliares, de pelve renal e ureter)
2. Casos de CCR em no mínimo 2 gerações;
3. Pelo menos 1 caso de CCR < 50 anos de idade;
4. Exclusão do diagnóstico de PAF

Com a identificação das mutações nos genes MMR associadas à Síndrome foi possível construir um painel de análise de microssatélites composto pelos marcadores BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250. A partir disso, foram desenvolvidos os critérios de Bethesda, para selecionar pacientes com suspeita de Síndrome de Lynch a partir de análise de instabilidade de microssatélites (IMS) (Rodriguez-Bigas, 1997). Em 2004 esses critérios



foram revisados para inclusão da história familiar e características da patologia do CCR, foi sugerido que fossem incluídos mais marcadores mononucleotídeos na análise de IMS com o intuito de aumentar a sensibilidade da análise, e também que o termo HNPCC fosse reformulado, já que não representa os pacientes que desenvolvem tumores além do CCR (Umar e cols., 2004) (Quadro 2).

#### **Quadro 2: Critérios de Bethesda revisados.**

##### **BETHESDA (Umar e cols., 2004)**

Pelo menos um dos seguintes critérios deve ser preenchido:

1. CCR diagnosticado antes dos 50 anos de idade;
2. Presença de CCR sincrônico ou metacrônico, ou outro tumor do espectro Lynch independente da idade;
3. CCR com histologia sugestiva de alta instabilidade de microssatélites antes dos 60 anos de idade;
4. Probando com CCR e um ou mais familiares de 1º grau com tumor do espectro Lynch sendo um dos tumores diagnosticado antes dos 50 anos;
5. Probando com CCR e dois ou mais familiares de 1º ou 2º grau com tumores do espectro Lynch diagnosticados em qualquer idade.

Na população, os critérios de Amsterdam são associados com baixa sensibilidade (28–45%) mas alta especificidade (77–82%), enquanto os critérios de Bethesda são associados com alta sensibilidade (73–91%) e menor especificidade (77–82%). Assim, nenhum dos critérios fornece uma especificidade e sensibilidade de forma consistente, embora a história familiar seja um fator importante na avaliação do risco de desenvolvimento do CCR (Palomaky, 2009).

Com o maior entendimento da doença percebeu-se que muitas famílias diagnosticadas com Síndrome de Lynch, por apresentar mutações dos genes MMR, não preenchem os critérios de Amsterdam ou Bethesda (criados para identificar indivíduos com a Síndrome). E que o contrário, indivíduos que preenchem os critérios, não apresentam mutações em nenhum dos genes MMR. Devido a essas limitações, foi realizado um workshop em 2010 onde foi sugerido que qualquer pessoa com menos de 70 anos diagnosticada com CCR deve realizar os testes de IMS e de imunohistoquímica (IHQ) para esclarecer o diagnóstico de Síndrome de Lynch (Boland & Shike, 2010).

### 1.2.3 Características moleculares da Síndrome de Lynch

A Síndrome de Lynch é causada por uma deficiência no sistema de reparo de pareamento incorreto do DNA, também conhecido como *Mismatch Repair* (MMR), o qual é responsável pelo reconhecimento e correção de erros no pareamento entre as duas fitas do DNA que podem ocorrer durante o processo de replicação. Mutações germinativas em qualquer um dos principais genes do sistema MMR são associadas à Síndrome: *MLH1* (*mutL homolog 1*), *MSH2* (*mutS homolog 2*), *MSH6* (*mutS homolog 6*), e *PMS2* (*postmeiotic segregation increased 2*) (Mecklin e cols., 1995; Peltomaki e cols., 1997; Aaltonen cols. 1998).

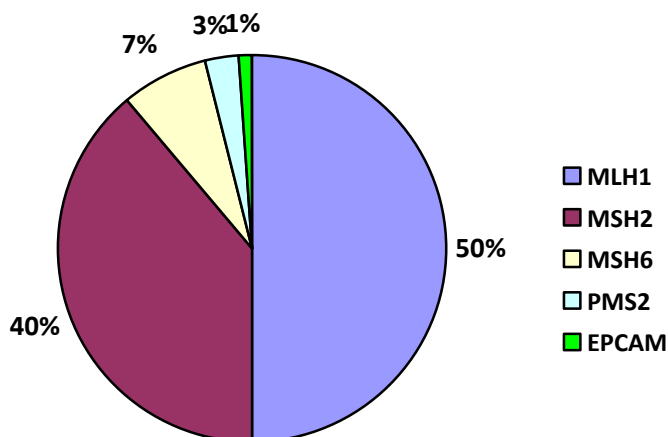
Estudos recentes têm mostrado que deleções na região 3' do gene *EPCAM* (*epithelial cell adhesion molecule*) podem causar o silenciamento do gene *MSH2* por alterações epigenéticas, por esse motivo, alterações em *EPCAM* também vem sendo associadas à Síndrome de Lynch (Ligtenberg e cols., 2009; Kovacs e cols., 2009).

A forma mais comum da Síndrome de Lynch é causada por mutações germinativas em heterozigose em um dos principais genes MMR, ou seja, o indivíduo já nasce com um dos alelos mutados e o outro sofre uma mutação somática. Indivíduos com mutações germinativas bialélicas representam uma forma mais rara e mais grave da doença, chamada de *Constitutional mismatch repair deficiency* (CMMR-D). Os pacientes desenvolvem câncer em idade muito jovem, normalmente na primeira década de vida, sendo os tipos mais comuns os hematológicos, cerebrais e colorretais, também é muito frequente o aparecimento de manchas café-com-leite, similares as de Neurofibromatose tipo 1 (NF1) (Wimmer & Etzler, 2008).

Ainda relacionada ao sistema MMR uma outra síndrome é diagnosticada quando os indivíduos preenchem os critérios de Amsterdam mas não é identificada mutação germinativa nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*, é a Síndrome de Câncer Colorretal Familiar Tipo X (FCCTX). Essa síndrome predispõe predominantemente ao desenvolvimento de CCR, os tumores são frequentemente estáveis quanto aos microssatélites e a média de idade de diagnóstico é mais tardia comparada à Síndrome de Lynch (Lindor, 2005).

De acordo com Peltomäki e colaboradores (2004), existem mais de 500 mutações patogênicas relacionadas à Síndrome de Lynch. Mutações germinativas nos genes *MLH1* e *MSH2* são encontradas em cerca 90% dos pacientes com a síndrome e são associadas com o fenótipo típico da doença (Figura 1). Enquanto mutações em *MSH6* e *PMS2* são menos frequentes, ocorrem em cerca de 10% dos casos e constituem uma forma atípica da Síndrome, com maior predominância de casos de câncer de endométrio e ovário em relação ao CCR,

além desses tumores apresentarem menor IMS (Kouraklis & Misiakos, 2005; Kohlmann, 2014).



**Figura 1: Proporção de indivíduos com mutações nos genes MMR.** Adaptado de Kohlmann, 2014.

Mutações somáticas que ocorrem na região promotora do gene *MLH1* também podem alterar sua função por causar a hipermetilação do gene e conseqüentemente sua inativação, por esse motivo, o estudo da metilação dos promotores de *MLH1* é importante na diferenciação entre tumores esporádicos e hereditários (Kámory e cols., 2003; Kim e cols., 2003).

### 1.3 Técnicas para rastreamento da Síndrome de Lynch

Técnicas de rastreamento e identificação de pacientes com Síndrome de Lynch identificam defeitos na via de reparo MMR. As mais utilizadas são a análise de Instabilidade de Microsatélite (IMS) e a Imunohistoquímica (IHQ), essas duas técnicas são recomendadas para todos os pacientes com CCR (ou todos os indivíduos com diagnóstico de CCR antes dos 70 anos de idade), independente dos critérios clínicos apresentados (Vasen, 2013).

Defeitos no sistema MMR levam ao acúmulo de erros em regiões denominadas microsatélites, que são pequenas sequências repetitivas em *tandem* presentes normalmente no genoma (Thibodeau e cols., 1993; Ionov e cols., 1993). Essas regiões podem ser utilizadas como um biomarcador para avaliar a perda de atividade do sistema MMR em células tumorais, já que regiões de repetições mono ou dinucleotídicas são vulneráveis a defeitos da

via MMR. Essa instabilidade genômica é chamada de instabilidade de microssatélite e representa uma característica marcante da Síndrome de Lynch (Umar e cols., 2004).

Mutações patogênicas normalmente levam a ausência do produto gênico, ou seja, alteração na expressão protéica, por esse motivo a técnica de IHQ é usada para identificar pacientes com suspeita da Síndrome de Lynch, pois permite identificar a presença/ausência das quatro proteínas MMR no tumor. A técnica apresenta algumas vantagens em relação a outros métodos, especialmente a IMS, por ser mais barata e de fácil realização, além de poder direcionar o gene a ter sua sequência analisada posteriormente para identificação de mutações. No entanto, a técnica também tem limitações, já que está vulnerável a qualidade de preparação do tecido, coloração e interpretação feita pelo patologista (Bonis e cols., 2007).

Outra técnica que pode ser utilizada quando uma mutação de ponto não é identificada, é a *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), que detecta a presença de rearranjos gênicos (deleções e duplicações de um ou mais éxons), os quais não são detectados por técnicas de sequenciamento do DNA. Esse tipo de alteração representa de 5-20% das alterações dos genes MMR e não é detectada por técnicas convencionais de varredura de mutações (Wijnen, 1998; Wang, 2003). Os rearranjos correspondem a 20% das variantes patogênicas em *MSH2* e *PMS2*, 5% em *MLH1*, 7% em *MSH6* e 100% em *EPCAM* (Kohlmann, 2014).

#### **1.4 A Síndrome de Lynch no Brasil**

No Brasil não é muito grande o número de estudos que envolvem pacientes com Síndrome de Lynch. O estudo de Rossi e cols. (2002) mostra o resultado da análise dos genes *MSH2* e *MLH1* em 25 pacientes que preenchem os critérios clínicos da Síndrome, entre os dois genes estudados foram encontradas 10 diferentes mutações, sendo oito delas em *MLH1*.

Em 2004 foi publicado o estudo de Oliveira Ferreira e cols., mostrando a frequência de tumores extracolônicos em 29 famílias que preenchem critérios de Amsterdam I ou II. Entre estes, os tumores mais frequentes nas mulheres foram de endométrio (26,5%) e mama (26,5%), e nos homens, o de estômago (35,1%). Outro trabalho do mesmo grupo, avaliando um número maior de famílias (n=60) encontrou entre os 2.095 indivíduos analisados, 200 tumores extracolônicos. No sexo feminino, o câncer de mama foi o mais frequente (26%), seguido pelo câncer de endométrio (16,3%) e colo do útero (16,3%); no sexo masculino o tumor mais frequente foi de próstata (20,8%) e estômago (13,3%) (da Silva e cols., 2010).

Também em 2010, o trabalho de Cossio e cols. demonstrou que entre as 30 mulheres avaliadas, todas com câncer de endométrio diagnosticado antes dos 50 anos de idade, 12 (40%) apresentam deficiência do sistema MMR (identificada por IHQ e/ou IMS), mostrando a alta frequência desse tumor na Síndrome de Lynch, em concordância com os trabalhos anteriormente citados.

Um estudo de prevalência realizado em ambulatório de coloproctologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (Koehler-Santos, 2011) relata que em 212 pacientes não-relacionados diagnosticados com CCR, 22 apresentam critérios de Bethesda e 100 de Amsterdam; 61 (29%) têm história familiar de CCR; 45 (21,2%) foram diagnosticados antes dos 50 anos de idade e 11 (5,2%) tiveram mais de um CCR primário.

Mas recentemente, foi publicado um estudo em que foram analisados 88 pacientes pelo sequenciamento de *MSH2*, *MLH1* e *MSH6* para avaliar a sensibilidade e especificidade de preditores para mutações na Síndrome de Lynch, nesse estudo, 16 mutações patogênicas foram encontradas em *MSH2* e 15 em *MLH1*, não foram encontradas mutações patogênicas em *MSH6* (Monteiro Santos e cols., 2012).

## **1.5 O sistema MMR de reparo do DNA**

O reparo do DNA é essencial para manutenção da estabilidade genética, pois apesar da eficiência das polimerases no processo de replicação e de sua capacidade de exonuclease, erros de pareamento podem acontecer no processo de replicação. Uma das vias de reparo que atua no processo de correção desses erros é a via denominada *Mismatch Repair* (MMR), um mecanismo pós-replicativo de manutenção do genoma.

A via MMR é responsável por corrigir erros de substituições de bases assim como alças de inserções e/ou deleções geradas durante a replicação de DNA. Por existir em diversos organismos, das bactérias até o homem, é considerada uma via de reparo bem conservada (Kunkel, 2005). Em mamíferos, a perda de atividade do sistema MMR contribui para o início do processo carcinogênico.

O processo de reparo por MMR em procariontes é iniciado quando os erros são reconhecidos pela proteína homodimérica MutS. Após o reconhecimento, a outra proteína homodimérica MutL atua em conjunto para ativar a clivagem do nucleotídeo, que é feita pela endonuclease MutH, gerando a excisão da base pareada incorretamente. Em seguida atuam a

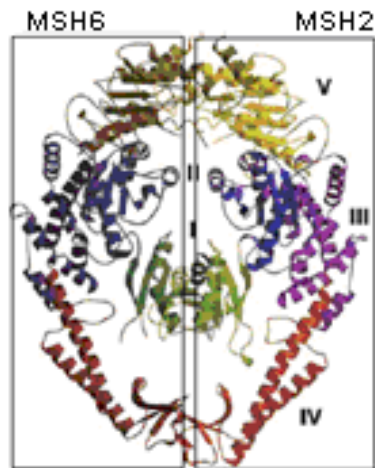
DNA Polimerase III e a ligase, restaurando a fita dupla igualmente à parental (Hsieh & Yamane, 2008).

Em eucariontes o processo é muito parecido, atuam os homólogos de MutS: MSH2 e MSH6 e os homólogos de MutL: MLH1 e PMS2. Uma das diferenças entre a via MMR de eucariontes e procariontes é que em procariontes MutS e MutL atuam como homodímeros, e em eucariontes, só são ativos como heterodímeros, MutS $\alpha$  (MSH2 + MSH6), MutS $\beta$  (MSH2 + MSH3) e MutL $\alpha$  (MLH1 + PMS2) (Shia, 2008). O heterodímero MutS $\alpha$  liga-se aos erros de pareamento e a curtas alças de deleção ou inserção (IDLs), já MutS $\beta$  liga-se a longas IDLs (Drummond e cols., 1995; Alani, 1996; Matton e cols., 2000).

Outra diferença é que em procariontes o reconhecimento da fita que deve ser corrigida é feito por MutH, pelo padrão de metilação na fita recentemente sintetizada e, portanto, não metilada. Em eucariontes não ocorre esta metilação, nem existe um homólogo de MutH, o processo de reconhecimento da lesão ainda é incerto (Iyer, 2006).

O processo de reparo em eucariontes começa quando MutS $\alpha$  ou MutS $\beta$  liga-se a uma base erroneamente pareada, logo após, ocorre a interação do heterodímero com a PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*), que atua de forma conjunta com os complexos que atuam na MMR, principalmente no seu recrutamento para a forquilha de replicação por meio de uma proteína denominada PIP (*PCNA Intereaction Protein*) associada a MSH6 ou MSH3.

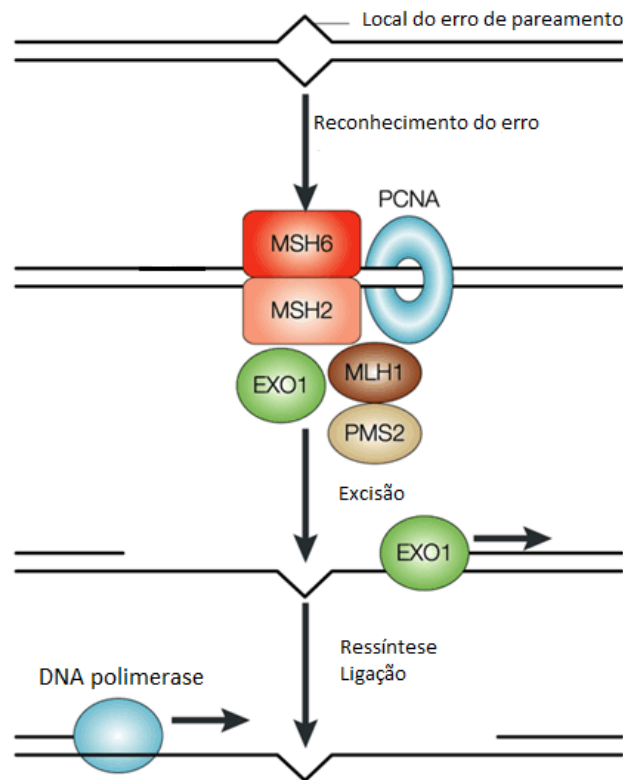
As proteínas MSH2 e MSH6 são formadas por cinco domínios mais uma região N-terminal, presente apenas em MSH6. Os domínios I e IV ligam-se ao DNA, envolvendo-o de forma circular. O domínio I possui uma região conservada (Phe-X-Glu) importante para detecção do mau pareamento. O domínio II atua como um conector e o III permite o distanciamento, assim como a ligação, entre os domínios IV e V, sendo este último, importante para ligação ao ATP e hidrólise (Figura 2) (Kunkel & Erie, 2005; Warren, 2007).



**Figura 2: Complexo MutSa.** Representação da configuração do complexo MutSa, mostrando os cinco domínios em que MSH6 e MSH2 são divididos em diferentes cores (em amarelo: Domínio V, em azul: Domínio II, em lilás: Domínio III, em vermelho: Domínio IV e em verde: Domínio I). Adaptada de Kunkel TA & Erie DA (2005).

Após a ligação de MutS e MutL $\alpha$ , que resulta em um complexo ternário com interação proteína-proteína e DNA-proteína, as interações são moduladas por ATP/ADP. O complexo é considerado ativo, ou seja, ligado ao local do mau pareamento, na presença de ADP e está inativo com o ATP. Assim, a mudança de ADP para ATP resulta na dissociação do complexo do local onde existe o erro e permite a continuidade do processo, que exige a excisão do erro e ressíntese (Gradia e cols., 1997).

A quebra para excisão do pareamento incorreto ocorre pela atividade de endonuclease exercida por PMS2, sendo que a excisão é feita por EXO1, gerando um fragmento de fita simples, que é ressintetizado pela polimerase Pol $\delta$ , restaurando a fita dupla e finalizando o processo de reparo (Figura 3) (Kunkel & Erie, 2005).



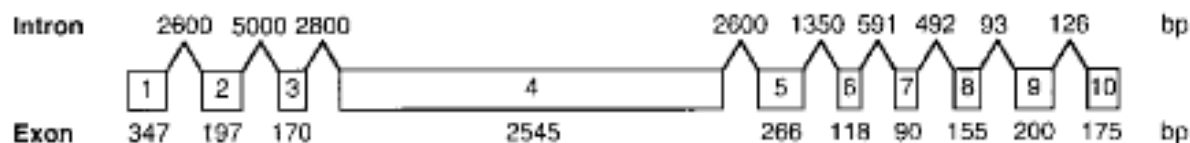
**Figura 3: Ilustração esquemática do sistema de reparo MMR.** Adaptada de Martin & Scharff (2002).

### 1.6 O gene *MSH6*

Em comparação aos genes *MLH1* e *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* são menos estudados, inicialmente denominado *G/T mismatch Binding Protein* (GTBP), o *MSH6* é considerado como um gene *housekeeping* e estudos indicam que tem seus níveis regulados conforme a fase do ciclo celular, pois os níveis de mRNA aumentam durante a fase G1, entretanto, isso não significa um aumento na quantidade de proteína. Sabe-se que a proteína *MSH2* estabiliza *MSH6* por eles existirem como heterodímeros, assim, elevações nos níveis de *MSH6* que não são acompanhadas por seu par resultam na degradação do excesso de *MSH6* livre (Szadkowski, 2002; Palombo e cols., 1995; Marra e cols., 1998).

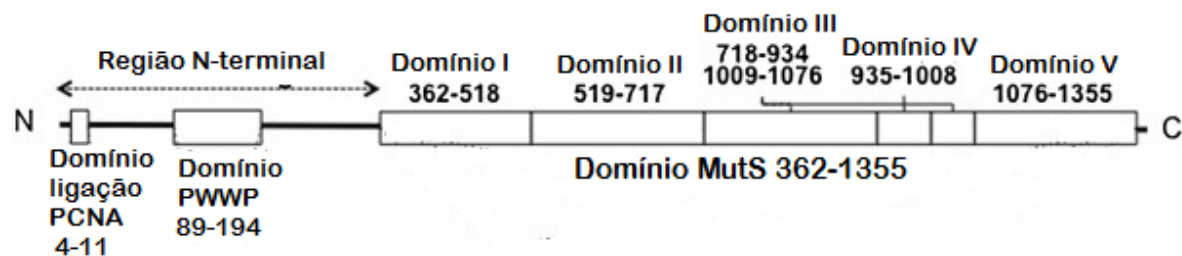
O gene *MSH6* (MIM#600678) está localizado no cromossomo 2p16.3, distante aproximadamente a 1Mb de *MSH2*, e possui 10 éxons (Figura 4). O mRNA transcrito é de 4245pb, o qual codifica uma proteína de 160kDa, formada por 1360 aminoácidos (Acharya e cols., 1996).





**Figura 4: Distribuição dos éxons e íntrons no gene *MSH6* (Acharya e cols., 1996).**

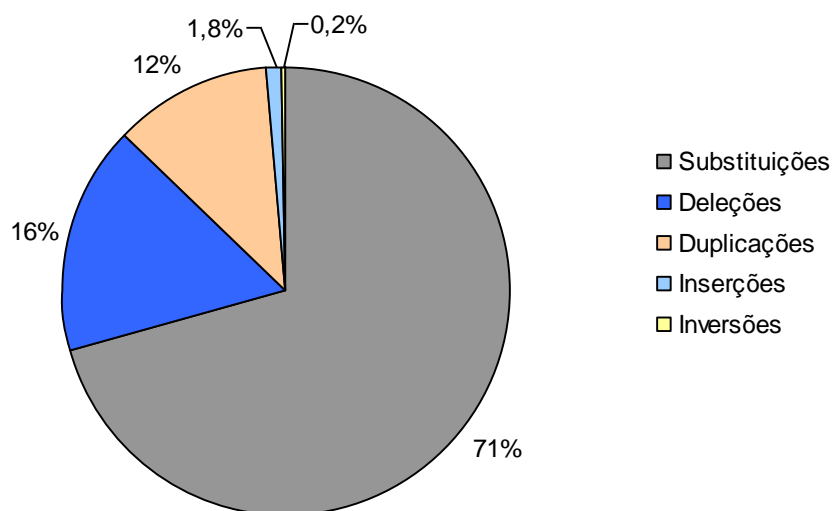
Esse gene está organizado em uma região N-terminal, composta por um domínio de ligação à PCNA e um domínio PWWP (prolina-triptofano-triptofano-prolina) de ligação com a histona H3K36me3, importante para a ligação com a cromatina; e a região de ligação a MutS, composta por cinco domínios (Figura 5) (Kleczkowska e cols., 2001; Laguri e cols., 2008; Li e cols., 2013).



**Figura 5: Representação da região N-terminal e da organização dos domínios de ligação de *MSH6* à MutS (Terui e cols., 2013).**

Sabe-se que a frequência de variantes difere entre os éxons de um gene, em *MSH6*, o éxon 4 é o que apresenta maior número de alterações, sendo que ele corresponde a quase metade da região codificante do gene. Considerando a frequência de alterações a cada 100pb, os éxons 5, 9 e 10 são frequentemente os mais alterados (Woods e cols., 2007). Apesar disso, é considerado que o gene não apresenta regiões *hotspots* (pontos onde as mutações ocorrem com uma frequência mais elevada), já que as mutações estão distribuídas nas regiões codificantes e regulatórias do gene (Jenkins, 2009).

Quanto aos tipos de alterações o gene apresenta alta frequência de substituições, dentre elas as mais comuns são as variações *missense*, ou seja, em que ocorre a troca de aminoácidos que levam a alterações na proteína (Figura 5) (Woods e cols., 2007; Nilbert, 2009).



**Figura 6: Alterações encontradas em *MSH6*.** Distribuição (%) conforme tipo de mutação e descrição no banco de dados LOVD (<http://www.insight-group.org/variants/database/>). Acessado em 07 de janeiro de 2015.

### 1.6.1 *MSH6* na Síndrome de Lynch

A partir de 1997 o gene *MSH6* começou a ser relacionado com a Síndrome de Lynch (Miyaki e cols., 1997; Akiyama e cols., 1997). Famílias que apresentam mutações nesse gene são caracterizadas por desenvolver CCR em idade mais avançada (51-57 anos), quando comparados a portadores de mutações em *MLH1* e *MSH2* (43-46 anos), e por ter maior risco de desenvolver câncer de endométrio (CE). Assim, mutações no gene são reconhecidas como frequente causa de uma forma atípica da Síndrome de Lynch (não preenchendo todos os critérios de Amsterdam), além de apresentar penetrância reduzida, baixa incidência de IMS e um padrão normal na imunohistoquímica para proteínas da via MMR (Tabela 2) (Kolodner, 1999; Wu, 1999; Hendriks e cols., 2004; Plaschke e cols., 2004; Baglietto e cols., 2009).

**Tabela 2: Comparação de características da Síndrome de Lynch conforme o gene mutado.**

Gene mutado	Idade de diagnóstico CE (anos)	RCV CE	Idade de diagnóstico CCR (anos)	RCV CCR	IMS CCR
<i>MLH1/MSH2</i>	47-49	40-50%	43-46	65-90%	Alta
<i>MSH6</i>	54	64-71%	51-57	73%	Estável

RCV= risco cumulativo vital; CE: câncer de endométrio; CCR: câncer colorretal; IMS: instabilidade de microssatélites.

Quanto à localização tumoral em portadores de mutações em *MSH6*, estudos indicam uma localização diferencial em relação a mutações nos outros genes, Berends e cols. (2002) relatou em seu trabalho que 70% dos tumores colorretais localizam-se no cólon descendente.

Essa forma atenuada da Síndrome de Lynch, assim como a baixa frequência de IMS que ocorre em portadores de mutações em *MSH6*, pode ser explicada pela compensação parcial que a proteína MSH3 exerce na ausência de MSH6, como essas duas proteínas têm de certo modo funções redundantes, MSH3 se liga ao MSH2 para formação do complexo que irá fazer o reconhecimento do erro e permite que o processo de reparo ocorra (Acharya, 1996; Umar, 1998, Marra, 1998).

Alguns estudos mostram que o *MSH6* pode corresponder a mais de 50% das mutações encontradas em indivíduos com a Síndrome de Lynch (Vasen, 2013). Frequências variáveis de mutações nos genes MMR têm sido relatadas por diferenças geográficas e pela presença de mutações fundadoras (Tabela 3).

Quanto à proporção de indivíduos com a Síndrome devido a mutações em *MSH6*, estudos têm demonstrado estimativas variáveis, Roncari (2007) concluiu que o gene é responsável por cerca de 5% a 10% dos pacientes com Síndrome de Lynch, Nilbert e cols. (2009) em um estudo na população dinamarquesa mostrou que este gene é responsável por 16% dos casos avaliados.

**Tabela 3: Proporções de mutações dos genes MMR, entre probandos com mutações identificadas em diferentes estudos com câncer colorretal e câncer de endométrio.**

Referência	Tipo de câncer	N	Mutações patogênicas identificadas N (%)	Distribuição das mutações por gene N (%)				
				<i>MLH1</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS2</i>	<i>EPCAM</i>
Hampel <i>et al</i> (2008)	Colorretal	113	18	4 (22,2)	10 (55,6)	3 (16,7)	1 (5,6)	NA
Julie <i>et al</i> (2008)	Colorretal	21	8	2 (25,0)	5 (62,5)	1 (12,5)	0 (0)	NA
Nilbert <i>et al</i> (2009)	Colorretal	240	88	26 (29,5)	43 (48,9)	19 (21,6)	NA	NA
Van Lier <i>et al</i> (2012)	Colorretal	42	27	5 (18,5)	5 (18,5)	11 (40,7)	5 (18,5)	1 (3,7)
Canard <i>et al</i> (2012)	Colorretal	38	25	4 (16,0)	19 (76,0)	2 (8,0)	NA	NA
Hampel <i>et al</i> (2006)	Endométrio	118	11	1 (9,0)	2 (18,2)	6 (54,5)	2 (18,2)	NA

NA - não avaliado.

Sjursen e cols. (2010) em um trabalho que avaliou 129 famílias da Noruega verificou mutações no gene *MSH6* em 26% dos casos. O mesmo estudo indica que o número de indivíduos identificados com mutações nesse gene pode estar sendo subestimado, pois os critérios clínicos de Amsterdam e Bethesda, usados para identificação de indivíduos com suspeita de Síndrome de Lynch, não são adequados para identificar portadores de mutações em *MSH6*. Portanto, a prevalência de mutações no gene deve ser avaliada com cuidado, assim como a penetrância e expressividade do gene, que podem ser diferentes das consideradas hoje (Sjursen, 2010).

## **CAPÍTULO 2. JUSTIFICATIVA**

Considerando que o Câncer Colorretal é um dos tumores malignos mais comuns no mundo, que cerca de 5-10% dos tumores colorretais são hereditários e que a grande maioria dos tumores colorretais hereditários se relaciona com mutações no sistema MMR, este projeto tem a sua primeira relevância na prevalência destas doenças.

O sistema MMR de reparo do DNA possui importante papel na proteção celular e para exercer esse papel, todas as proteínas envolvidas no processo de reparo devem ser funcionais. Nesse sentido, identificar variações responsáveis por alterações patogênicas das proteínas envolvidas na via MMR é de extrema importância para o entendimento dos processos envolvidos no desenvolvimento do tumor. Por bastante tempo, os estudos de Síndrome de Lynch concentraram-se na análise de dois genes do sistema MMR, *MLH1* e *MSH2*, que seriam os mais frequentemente mutados. No entanto, *MSH6* também exerce um papel fundamental no desempenho da via de reparo de pareamento incorreto do DNA, portanto, a análise deste gene torna-se igualmente importante para o melhor entendimento de sua função na via, bem como na predisposição ao câncer identificada nos pacientes diagnosticados com Síndrome de Lynch.

Mutações em *MSH6* estão fortemente associadas com câncer de endométrio, um tumor que em algumas séries aparece como o mais frequente em mulheres com a Síndrome, com uma prevalência ainda maior que o câncer colorretal no sexo feminino. Em dois estudos de nosso grupo envolvendo pacientes com critérios para síndrome de Lynch, um em que os probandos tinham CCR e outro em que os probandos tinham câncer de endométrio e deficiência do sistema MMR, a frequência de perda de expressão de *MSH6* por imunohistoquímica do tumor foi 23,5% (Koehler-Santos, P. Dados não-publicados) e 16,7% (Cossio, 2010), respectivamente. No estudo local de câncer de endométrio, a expressão de *MSH6* estava ausente em 50% dos casos com deficiência documentada do sistema MMR, constituindo a alteração mais comum (Cossio, 2010).

Considerando ainda que esta seja uma Síndrome Hereditária de Predisposição ao Câncer, a identificação de portadores de mutações germinativas torna-se essencial para o melhor manejo do paciente e dos seus familiares. Por se tratar de indivíduos de alto risco, o acompanhamento regular é importante pois permite o diagnóstico precoce, o que é essencial na prevenção do desenvolvimento de tumores. Além disso, a identificação de variantes patogênicas permite o diagnóstico preditivo em familiares ainda assintomáticos.

## **CAPÍTULO 3. OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo Geral**

Identificar e caracterizar mutações germinativas do gene *MSH6* em pacientes brasileiros(as) com diagnóstico clínico ou suspeita de Síndrome de Lynch.

### **3.2 Objetivos Específicos**

- Descrever o tipo e frequência de variantes de sequência e rearranjos no gene *MSH6* em um grupo de pacientes com Síndrome de Lynch, correlacionando com dados da literatura internacional;
- Realizar análise *in silico* do provável impacto das variantes encontradas no gene *MSH6* na função de sua respectiva proteína;
- Analisar potenciais relações genótipo-fenótipo;
- Analisar a relação entre as alterações encontradas com outros resultados histomoleculares (IHQ e IMS) já disponíveis dos pacientes incluídos no estudo.



**CAPÍTULO 4. *MSH6* mutation prevalence among patients with suspected Lynch syndrome in Brazil**

Artigo em elaboração conforme normas da revista *International Journal of Colorectal Disease*

## ***MSH6* mutation prevalence among patients with suspected Lynch syndrome in Brazil**

Nayê Balzan Schneider<sup>1</sup>, Clévia Rosset<sup>1</sup>; Brazilian Lynch Syndrome Consortium<sup>2</sup>, Patricia Ashton-Prolla<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Medicina Genômica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil.

<sup>2</sup> Carisi Anne Polanczyk, Rosane Schlatter, Suzi Alves Camey, Fabiano Souza, Luciane Cruz (Instituto de Avaliação de Tecnologia em Saúde); Roberto Giugliani, Silvia Liliana Cossio (Instituto Nacional de Genética Médica Populacional); Patricia Koehler-Santos, Luise Meurer, João Carlos Prolla, José Roberto Goldim, Cristina Netto, Rosane Paixão Schlatter (Hospital de Clínicas de Porto Alegre); Benedito Mauro Rossi, Edénir Inez Palmero, André Lopes Carvalho (Hospital de Câncer de Barretos); Maria Isabel Achatz (Hospital AC Camargo); Miguel Ângelo Moreira, Fernando Regla Vargas (Instituto Nacional de Câncer); Paulo Pimentel de Assumpção, Sérgio Lima Jr, Rommel Burbano, Sidney E. dos Santos (Universidade Federal do Pará e Hospital Universitário João de Barros Barreto).

**Correspondence:** Patricia Ashton-Prolla: pprolla@gmail.com Tel.: + 55 51 3359-8760 Fax: + 55 51 3359-8761. Centro de Pesquisa Experimental, Hospital de Clínicas de Porto Alegre. Porto Alegre, RS, Brasil, Rua Ramiro Barcelos 2350.

## **Abstract**

Mutations in *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, and *PMS2* genes are responsible for most of the cases of Lynch Syndrome (LS), a cancer predisposition syndrome caused by a deficiency of the DNA mismatch repair (MMR) system. *MLH1* and *MSH2* are the most commonly mutated genes and are associated with the classic LS phenotype. Mutations in *MSH6*, the focus of this study, are associated with an older age at colorectal cancer diagnosis, significantly increased risk of endometrial cancer in women and low prevalence of microsatellite instability (MSI). The prevalence of *MSH6* mutations in LS families is variable among different populations. In this study, we evaluated the presence of *MSH6* mutations and gene rearrangements in 68 Brazilian probands with colorectal cancer and a familial history suggestive of Lynch Syndrome. Genotyping was performed by Sanger sequencing and Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA). Tumors from all probands were screened for MMR deficiency using MSI and/or immunohistochemistry (IHC). Twenty-two patients (33,84%) exhibited loss of MSH6 expression by IHC but in none of them a known pathogenic alteration was identified. Three patients carried variants of unknown significance (VUS) which were analyzed by *in silico* mutation prediction models. These analyses suggest that two of them, c.2006T>C and c.3772C>G, are possibly pathogenic. We conclude that in this series of Brazilian patients suspected of LS, IHC is not sufficiently specific to restrict mutation testing to *MSH6* only. Among probands with CRC and suspected Lynch syndrome, mutations in *MSH6* appear to be responsible for a small percentage of cases this population.

## **Keywords**

*MSH6* gene, Lynch Syndrome, colorectal cancer, hereditary colorectal cancer.

## Introduction

Lynch Syndrome (LS) is an autosomal dominant cancer predisposition syndrome caused by germline mutations in one of the genes involved in DNA mismatch repair (MMR): *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*. Although the majority of mutations in LS families occur in one of the 4 MMR genes, recently, germline deletions in the epithelial cell adhesion molecule gene (*EPCAM*), adjacent to *MSH2*, have been also associated to the syndrome [1, 2]. MSH6 bind to MSH2 to form the MutSa complex, which functions in the recognition step of the mismatches repair. This complex associates with the MutLa complex (composed of MLH1 and PMS2), and recruits the proteins needed for DNA excision and repair.

As a result of MMR deficiency, frequently DNA replication errors occur in repeat sequences and cause the microsatellite instability (MSI), a hallmark of LS [3]. The core tumors of LS are colorectal, endometrial, ovarian, gastric, small intestine, hepatobiliary tract, upper urinary tract, and brain tumors.

Major differences in lifetime risks of cancer have been reported among MMR mutation carriers, according to the specific gene affected. Thus, *MSH6* mutation carriers appear to have lower colorectal but higher endometrial cancer risks compared to *MSH2* and *MLH1* mutation carriers [4-6]. According to one study, compared with the general population, *MSH6* mutation carriers had an eightfold increased risk of colorectal cancer and twenty-sixfold increased risk of endometrial cancer [5]. Furthermore, *MSH6* mutation carriers tend to be diagnosed with colorectal cancer at an older age and with endometrial cancer at a younger age than carriers of mutations in the *MLH1* or *MSH2* [6, 7]. Endometrial cancer represents the most common clinical manifestation of LS among female *MSH6* mutation carriers [8, 9].

There is still some controversy on the prevalence of *MSH6* mutations in LS families, since criteria commonly used to identify suspected cases may be less sensitive for detecting *MSH6* mutation carriers and MMR IHC analysis, a very common screening strategy to identify tumors of LS patients often shows normal MMR protein expression patterns in tumors of *MSH6* mutation carriers [9-13]. In Brazil, very little is known regarding *MSH6* mutation prevalence in LS families. Six studies including Brazilian LS patients (about 450 study subjects in total) were identified in the literature, but only two of have molecular testing results on MMR genes but only one study included *MSH6* analysis in 88 patients, and no mutations were found in the gene [14-19].

## Methods

### *Patients and Samples*

Five medical centers who provide cancer genetics services in three regions of Brazil participated in the study. Unrelated, cancer-affected probands from hereditary cancer registries of the participating institutions, who fulfilled the Amsterdam criteria for LS or Bethesda guidelines for MMR testing were included after signature of informed consent. Genomic DNA was isolated from peripheral blood lymphocytes using standard extraction protocols. Sixty-eight patients were recruited from (july of 2011) until (july of 2013) at Hospital de Clínicas de Porto Alegre (n=26) in the Southern region, Hospital de Câncer de Barretos (n=14), Hospital AC Camargo (n=14) and Instituto Nacional de Câncer (n=7) in the Southeastern region and from Hospital João de Barros Barreto (n=7) in the Northern Region of Brazil. Information about the family histories and a pedigree was obtained from all patients by review of previous clinical records and interviews; pathology reports and additional relevant clinical information were obtained from review of medical records.

### *MSH6 genotyping*

Germline mutations in *MSH6* were investigated in all 68 patients by Sanger sequencing and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Analysis of point mutations was performed by Polymerase chain reaction (PCR) amplification of the entire coding region and exon-intron junctions (at least 70 bp into intronic regions) followed by direct sequencing done on an ABI3500 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers used were previously described by Hedge [20]. Sequences were aligned to the wild type sequence obtained from NCBI (NG\_007111), and analyzed for sequence variations using CLC Main Workbench software v7.5. To detect large genomic rearrangements the SALSA MLPA Kit P072-C1 was employed according to manufacturer's instructions (MRC Holland, Netherlands). Amplification products were identified using an ABI3500 capillary sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and evaluated using the software Coffalyser.net. Commercial DNA samples were used as reference.

### *Mutation nomenclature and classification*

Mutation nomenclature followed the Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines. Mutations were considered to be deleterious if they: a) were classified as pathogenic in the LOVD, NCBI or HGMD databases; b) introduced a premature stop codon in the protein sequence (nonsense or frameshift mutation) or c) occurred at donor or acceptor splice sites.

### *In silico analyses*

*MSH6* variants that were not described or classified regarding pathogenicity at the databases NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>), LOVD (<http://www.insight-group.org/variants/database/>) and HGMD (<http://www.hgmd.org>) databases were classified by *in silico* predictions. PolyPhen 2 (Polymorphism Phenotyping), HOPE (Have Your Protein Explained), SIFT (Sorting Intolerant from Tolerant), SDM (Site Directed Mutator), Panther (Protein Analysis Through Evolutionary Relationships), Mutation Assessor were applied to missense alterations and BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) to small intronic alterations.

### *MSI Analysis*

To assess microsatellite instability (MSI), we used the Promega MSI Analysis System V1.1 (Promega, Madison, WI, USA) consisting in a multiplex panel of five mononucleotide markers (BAT-25, BAT-26, MONO-27, NR-21, NR-24). Amplicons were separated by size through capillary electrophoresis on an ABI PRISM 3130xl Genetic Analyser and results analysed using the GeneMapper ID 3.2 Analysis Software. Tumors were classified as having High Microsatellite Instability (MSI-H) when they showed MSI for at least two or more markers; the remaining were classified as Microsatellite Stable (MSS).

### *IHC analysis*

Immunohistochemistry (IHC) for MLH1, MSH2, MSH6 and PMS2 proteins was performed on formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissues using commercially available monoclonal antibodies against mlh1 (Mouse Anti-MLH1 Clone 14, Zymed), msh2 (Mouse Anti-Msh2 Clone FE11, Zymed), msh6 (Purified Mouse Anti-

MSH6 Clone 44, Zymed) and pms2 (Mouse Anti-PMS2 Monoclonal Antibody Clone A16-4, BD Pharmingen) proteins. Normal tissue adjacent to the tumor was used as positive normal control in all cases. IHC stains were reviewed independently by two pathologists who were blinded for MSI results.

## Results

Most of the 68 patients recruited were female, median age at cancer diagnosis was under the age of 50 years and most probands had been diagnosed with colorectal cancer (CRC) (**Table 1**). Sixty-five FFPE tumor tissues were available for IHC analysis and among these, 22 (33.8%) exhibited loss of MSH6 expression and 12 of this (54.5%) exhibited loss of both MSH6 and its partner MSH2 (**Table 2**). MSI analysis was possible in only 31 tumors, nineteen of which (61.3%) showed MSI-H. Of the 22 cases with loss of MSH6 expression, 12 (54.5%) were analysed for MSI and MSI-H was observed in 9 (75%).

Altogether, 26 variants were detected by direct sequencing, but no pathogenic mutations or *MSH6* gene rearrangements were identified. The variants observed included 20 different single nucleotide variants (SNVs) and six deletion/insertion variants (DIVs). Of the 12 exonic SNVs, five were missense and seven silent mutations. Intronic variants were more commonly observed than the exonic variants (**Table 3**).

Of the variants identified, one is novel (c.719G>A) and seven are variants of uncertain significance (VUS) considering the three main databases analyzed (c.457+52\_457+53delTGinsGTGA; c.3646+35\_3646+38delATCT; c.3802-44delT, c.4002-10dupT, c.2006T>C; c.3772C>G; c.719 G>A). For these variants, mutation prediction models were used in an attempt to define pathogenicity. For neither of the intronic variants, alternative splicing was indicated by the BDGP splice site prediction tool. Three exonic variants identified in four patients were evaluated by additional *in silico* tools that predict the effect of missense alterations by sequence conservation and/or protein structure based methods and results are summarized in **Table 4**, indicating that two of them is possibly deleterious. Clinical molecular details of the three VUS identified are summarized in **Table 5** and pedigrees of the four probands with *MSH6* VUS are depicted in Figure S1.

Since we did not identify any known deleterious germline mutations in *MSH6*, despite a significant proportion of loss of MSH6 expression by IHC in the series, we reviewed additional *MSH2* genotyping results from the patients included here. Five of the 12 probands showing simultaneous loss of expression of MSH2 and MSH6 had known deleterious germline *MSH2* point mutations and two additional patients had an exon 1 deletion of *MSH2* detected by MLPA (7/12 patients with *MSH2* mutations, 58.3%). In the group of 10 patients with tumors showing loss of MSH6 without loss of MSH2, only one had deleterious germline *MSH2* mutations (1/10, 10%). Considering all 22 patients with abnormal MSH6 expression by IHC, germline deleterious *MSH2* mutations were likely responsible for this phenotype in 36.4% (8/22) of the patients.

## Discussion and Conclusion

Estimates about the frequency of LS patients carrying *MSH6* mutations vary from 5 to 26% depending on the population analysed [10,21,22]. Studies published from German and Dutch registries, for instance, showed that *MSH6* is responsible for 14% of all LS diagnoses [23]; another study from the Danish population

identified *MSH6* mutations in 16% of LS families [24]. The highest mutation prevalence was reported in Norway (26%) and the lowest (5%), from a region in Italy [10,22].

In our study, no pathogenic *MSH6* mutations or gene rearrangements were identified. In spite of the small sample size of the study, and the predominance of probands with colorectal cancer, about one third of the patients recruited had loss of MSH6 protein expression by immunohistochemistry (IHC), and at least some of these cases would be expected to be attributable to germline *MSH6* mutations. In addition, although previous authors suggested that up to 10–20% of tumours with loss of MSH6 expression may harbour germline *MSH6* rearrangements, these alterations were also not identified in our series [25,26].

Most tumors from Lynch Syndrome patients are characterized by microsatellite instability (MSI) and loss of MMR proteins expression detected by IHC. However, IHC results can be ambiguous. Specifically regarding MSH6 expression, a recent study reported that approximately 30% of colorectal tumors occurring germline *MSH6* mutation carriers had intact MSH6 expression [12]. The opposite has also been described; tumors can show loss of MSH6 expression by IHC without identifiable mutations in the gene. Several authors demonstrated previously that this can be explained by the presence of a germline *MSH2* mutation. MSH6 protein may become unstable when there is a decrease in the expression or significant conformational alterations of its partner, MSH2 [27,28]. Therefore, germline mutations in *MSH2* can result in loss of both proteins, MSH2 and MSH6. In addition, somatic epigenetic *MSH6* silencing events, and even *MSH2* epimutation may cause absence of MSH2 and MSH6 [29,30]. Moreover, equivocal IHC results are not absolutely unexpected, but should be minimized with the routine use of internal controls and review by more than one pathologist [25].

Recently, Joost *et al* [31] identified that intratumoral heterogeneity can lead to heterogeneous MMR protein expression profiles between different tumor blocks or within the same tumor block of a patient, and consequently, false-negative or false-positive evaluations can occur. When inconsistencies are identified, one important additional step in tumor screening is analysis of MSI. Unfortunately we were unable to perform tumor MSI analysis in 45% of this series, both for technical reasons and sample availability. Although this is an important limitation of the study, it is possible that most of the MSI-H tumors showing loss of MSH6 expression were caused by germline mutations in *MSH2*.

Regarding the sequence variants identified in this study, most were located in exon 4, including two of the three missense alterations with uncertain significance (or no information on pathogenicity) according the databases LOVD, NCBI and HGMD. This is not unexpected due to the large exon size, corresponding to half of the extension of the entire coding region of the gene. However, the location of the mutation in a functional domain does not by itself automatically confer pathogenicity [32,33].

The novel variant c.719G>A (identified in two patients) results in an Arginine to Glutamine change at position 240 in the N-terminal region (NTR) of *MSH6*. This region comprises the well described PWWP (aminoacids 89-194) and PCNA binding (aminoacids 4-11) domains [34]. Gassman *et al* [34] demonstrated that a single point mutation (Ser285Ile) in the NTR region can affect cellular localization of the MSH6 protein, without impairing its ability to heterodimerize with MSH2 or hydrolyze ATP. The *in silico* analysis that we used to further characterize this variant indicated that Arg240Gln is a non pathogenic alteration, but this prediction does not exclude the possibility of the variant influencing MSH6 localization, as occurs with Ser285Ile. This interpretation is consistent with the IHC results of one of the Arg240Gln carriers, which showed loss of nuclear MSH6 expression. A known pathogenic mutation (c.718 C>T) in the same codon has been described and results

in a stop codon (p.Arg240X) and a truncated protein [35,36]. The other two VUS identified showed conflicting results after analysis with the mutation predictors. Such contradictory results after *in silico* predictions are not uncommon and have been explained by the fact that different features are used to evaluate amino acid alterations and their impact on the protein, i.e. sequence and evolutionary conservation-based methods (SIFT, Mutation assessor, Panther, SDM) and protein sequence and structure-based methods (HOPE, PolyPhen).

Ile669Thr was identified in a CRC-affected patient with normal IHC results. This alteration is located in the connector *MSH6* domain and is classified by LOVD as a VUS, although SIFT and HOPE suggest that it is possibly a pathogenic alteration. Using multiple sequence alignments (MSAs) SIFT [37] calculated this amino acid change as a 'damaging' substitution. HOPE concluded that "it is possibly damaging" because the residues identified in the homologous sequences analyses are different from the threonine (mutant amino acid) observed in this change. Secondly, differences in size and hydrophobicity in mutant amino acid cause loss of external interactions [38].

Finally, Gln1258Glu was identified in a CRC-affected patient with loss of MLH1 expression in the tumor. This variant is located in the ATPase domain and is classified as a pathogenic mutation only by HOPE. This predictor shows that Glutamic acid (mutant amino acid) differs in charge from Glutamine which could lead to protein folding problems. Further intra-familial variant segregation analyses and population frequency studies should be undertaken to determine if there is a real effect of these variants on protein structure and function.

Results of this study suggest that *MSH6* mutations are not common among Brazilian LS families and that loss of *MSH6* expression in LS-associated tumors appears to be a poor predictor of *MSH6* germline mutations in this population. Germline alterations of *MSH2*, identified in a significant proportion of probands reinforce the importance of the comprehensive study of MMR genes to determine the disease causing genotype in LS families.



## References

1. Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of *MSH2* in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41:112-17. doi: 10.1038/ng.283
2. Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, Otto S, Olah E (2009) Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30:197-203. doi: 10.1002/humu.20942
3. Boland CR, Goel A (2010) Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology* 138:2073-87. doi: 10.1053/j.gastro.2009.12.064
4. Bonadona V, Bonaiti B, Olschwang S, Grandjouan S, Huiart L, Longy M, Guimbaud R, Buecher B, Bignon YJ, Caron O, Colas C, Noguès C, Lejeune-Dumoulin S, Olivier-Faivre L, Polycarpe-Osaer F, Nguyen TD, Desseigne F, Saurin JC, Berthet P, Leroux D, Duffour J, Manouvrier S, Frébourg T, Sobol H, Lasset C, Bonaïti-Pellié C; French Cancer Genetics (2011) Network Cancer risks associated with germline mutations in *MLH1*, *MSH2*, and *MSH6* genes in Lynch syndrome. *JAMA* 305:2304-2310. doi: 10.1001/jama.2011.743
5. Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, White DM, Wagner A, Gomez Garcia EB, Vriens AH; Dutch Lynch Syndrome Study Group, Cartwright NR, Barnetson RA, Farrington SM, Tenesa A, Hampel H, Buchanan D, Arnold S, Young J, Walsh MD, Jass J, Macrae F, Antill Y, Winship IM, Giles GG, Goldblatt J, Parry S, Suthers G, Leggett B, Butz M, Aronson M, Poynter JN, Baron JA, Le Marchand L, Haile R, Gallinger S, Hopper JL, Potter J, de la Chapelle A, Vasen HF, Dunlop MG, Thibodeau SN, Jenkins MA (2009) Risks of Lynch syndrome cancer for *MSH6* mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 102: 193-201. doi: 10.1093/jnci/djp473
6. Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, Sandkuijl L, Møller P, Genuardi M, Van Houwelingen H, Tops C, Van Puijnenbroek M, Verkuijlen P, Kenter G, Van Mil A, Meijers-Heijboer H, Tan GB, Breuning MH, Fodde R, Wijnen JT, Bröcker-Vriens AHJT, Vasen H (2004) Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to *MSH6* mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 127:17-25. doi:10.1053/j.gastro.2004.03.068
7. Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP (1999) Germ-line *msh6* mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59:5068-5074
8. Wijnen J, de Leeuw W, Vasen HF, van der Klift H, Møller P, Stormorken A, Meijers-Heijboer H, Lindhout D, Menko F, Vossen S, Möslein G, Tops C, Bröcker-Vriens A, Wu Y, Hofstra R, Sijmons R, Cornelisse C, Morreau H, Fodde R (1999) Familial endometrial cancer in female carriers of *MSH6* germline mutations. *Nature Genet* 23:142-144. doi:10.1038/13773
9. Berends MJW, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RGJ, Van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, De Vries EGE, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CHCM, Van der Zee AGJ, Hofstra RMW, Kleibeuker JH (2002) Molecular and clinical characteristics of *MSH6* variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70:26-37. doi: 10.1086/337944
10. Sjursen W, Haukanes BI, Grindedal EM, Aarset H, Stormorken A, Engebretsen LF, Jonsrud C, Bjørnevoll I, Andresen PA, Ariansen S, Lavik LAS, Gilde B, Bowitz-Lothe IM, Mæhle L, Moller P (2010) Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify *MSH6* mutation carriers *J Med Genet* 9: 579-585. doi: 10.1136/jmg.2010.077677
11. Wu Y, Berends MJW, Mensink RGJ, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AGJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CHCM, Hofstra RMW (1999) Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with *MSH6* germline mutations. *Am J Hum Genet* 65:1291-1298. doi: 10.1086/302612

12. Okkels H, Lindorff-Larsen K, Thorlasius-Ussing O, Vyberg M, Lindebjerg J, Sunde L, Bernstein I, Klarskov L, Holck S, Krarup HB (2012) MSH6 mutations are frequent in hereditary nonpolyposis colorectal cancer families with normal pMSH6 expression as detected by immunohistochemistry. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 20:470-7. doi: 10.1097/PAI.0b013e318249739b
13. Boland CR, Koi M, Chang DK, Carethers JM (2008) The biochemical basis of microsatellite instability and abnormal immunohistochemistry and clinical behavior in Lynch Syndrome: from bench to bedside. *Fam Cancer* 7:41-752. doi: 10.1007/s10689-007-9145-9
14. Cossio SL, Koehler-Santos P, Pessini SA, Mónico H, Edelweiss MI, Meurer L, Errami A, Coffa J, Bock H, Saraiva-Pereira ML, Ashton-Prolla P, Prolla JC (2010) Clinical and histomolecular endometrial tumor characterization of patients at-risk for Lynch syndrome in South of Brazil. *Fam Cancer* 2:131-9
15. Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, Toshihiko Nakagawa W, Aguilar S Jr, Monteiro Santos EM, Vierira Costa ML, Lopes A (2004) Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 1:41-7
16. da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Valentin MD, Rossi BM, de Oliveira Ferreira F (2010) Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. *Fam Cancer* 4:563-70
17. Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ (2002) hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 6:555-61
18. Koehler-Santos P, Izetti P, Abud J, Pitroski CE, Cossio SL, Camey SA, Tarta C, Damin DC, Contu PC, Rosito MA, Ashton-Prolla P, Prolla JC (2011) Identification of patients at-risk for Lynch syndrome in a hospital-based colorectal surgery clinic. *World J Gastroenterol* 6:766-73.
19. Monteiro Santos EM, Valentin MD, Carneiro F, de Oliveira LP, de Oliveira Ferreira F, Junior SA, Nakagawa WT, Gomy I, de Faria Ferraz VE, da Silva Junior WA, Carraro DM, Rossi BM (2012) Predictive models for mutations in mismatch repair genes: implication for genetic counseling in developing countries. *BMC Cancer*. 12:64
20. Hegde M, Blazo M, Chong B, Prior T, Richards C (2005) Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *J Mol Diagn* 7:525-34 doi:10.1016/S1525-1578(10)60584-3
21. Peltomäki P, Vasen H (2004) Mutations Associated with HNPCC Predisposition — Update of ICG-HNPCC/INSiGHT Mutation Database. *Dis Markers* 20: 269–276. doi: 10.1155/2004/305058
22. Roncari B, Pedroni M, Maffei S, Di Gregorio C, Ponti G, Scarselli A, Losi L, Benatti P, Roncucci L, De Gaetani C, Camellini L, Lucci-Cordisco E, Tricarico R, Genuardi M, Ponz de Leon M (2007) Frequency of constitutional MSH6 mutations in a consecutive series of families with clinical suspicion of HNPCC. *Clin Genet* 3:230-7. doi: 10.1111/j.1399-0004.2007.00856.x
23. Engel C, Loeffler M, Steinke V, Rahner N, Holinski-Feder E, Dietmaier W, Schackert HK, Goergens H, von Knebel Doeberitz M, Goecke TO, Schmiegel W, Buettner R, Moeslein G, Letteboer TG, Gómez García E, Hes FJ, Hoogerbrugge N, Menko FH, van Os TA, Sijmons RH, Wagner A, Kluij I, Propping P, Vasen HF. J (2012) Risks of less common cancers in proven mutation carriers with lynch syndrome. *Clin Oncol* 10:4409-15. doi: 10.1200/JCO.2012.43.2278
24. Nilbert M, Wikman FP, Hansen TVO, Krarup HB, Orntoft TF, Nielsen FC, Sunde L, Gerdes A-M, Cruger D, Timshel S, Bisgaard M-L, Bernstein I, Okkels H (2009) Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam Canc* 8:75-83. doi: 10.1007/s10689-008-9199-3

25. Shia J (2008) 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* 10:293-300. doi: 10.2353/jmoldx.2008.080031
26. Plaschke, J., Ruschoff, J., Schackert, H. K (2003) Genomic rearrangements of hMSH6 contribute to the genetic predisposition in suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. *J Med Genet* 40:597-600. doi:10.1136/jmg.40.8.597
27. Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J (1998) Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:8568-8573
28. Chang DK, Ricciardiello L, Goel A, Chang CL, Boland CR (2000) Steady-state regulation of the human DNA mismatch repair system. *J Biol Chem* 275:18424-18431. doi: 10.1074/jbc.M001140200
29. Peltomäki P (2014) Epigenetic mechanisms in the pathogenesis of Lynch syndrome. *Clin Genet* 85:403-12. doi: 10.1111/cge.12349
30. Bearzatto A, Szadkowski M, Macpherson P, Jiricny J, Karran P (2000) Epigenetic regulation of the MGMT and hMSH6 DNA repair genes in cells resistant to methylating agents. *Cancer Res* 60:3262-3270.
31. Joost P, Veurink N, Holck S, Klarskov L, Bojesen A, Harbo M, Baldetorp B, Rambech E, Nilbert M (2014) Heterogenous mismatch-repair status in colorectal cancer. *Diagn Pathol* 9:126. doi: 10.1186/1746-1596-9-126
32. Wielders EA, Houlleberghs H, Isik G, te Riele H (2013) Functional analysis in mouse embryonic stem cells reveals wild-type activity for three MSH6 variants found in suspected Lynch syndrome patients. *PLoS One* 8:e74766. doi: 10.1371/journal.pone.0074766
33. Kariola R, Otway R, Lonnquist KE, Raevaara TE, Macrae F, Vos YJ, Kohonen-Corish M, Hofstra RM, Nyström-Lahti M (2003) Two mismatch repair gene mutations in a colon cancer patient - which one is pathogenic?. *Hum Genet*. 112:105–109.
34. Gassman NR, Clodfelter JE, McCauley AK, Bonin K, Salsbury FR Jr, Scarpinato KD (2011) Cooperative nuclear localization sequences lend a novel role to the N-terminal region of MSH6. *PLoS One* 6:e17907. doi: 10.1371/journal.pone.0017907.
35. Ohmiya N, Matsumoto S, Yamamoto H, Baranovskaya S, Malkhosyan SR, Perucho M (2001) Germline and somatic mutations in hMSH6 and hMSH3 in gastrointestinal cancers of the microsatellite mutator phenotype. *Gene* 272:301-13. doi:10.1016/S0378-1119(01)00517-0
36. Yan HL, Hao LQ, Jin HY, Xing QH, Xue G, Mei Q, He J, He L, Sun SH (2008) Clinical features and mismatch repair genes analyses of Chinese suspected hereditary non-polyposis colorectal cancer: a cost-effective screening strategy proposal. *Cancer Sci* 99:770-780. doi: 10.1111/j.1349-7006.2008.00737.x
37. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature Protocols*. 4:1073-1081. doi: 10.1038/nprot.2009.86
38. Venselaar H, Te Beek TA, Kuipers RK, Hekkelman ML, Vriend G (2010) Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC Bioinformatics*. 11:548. doi: 10.1186/1471-2105-11-548

**Table 1:** Clinical features of the 68 unrelated probands included in the study.

	<b>N (%)</b>	<b>Median</b> (minimum-maximum)
<b>Sex</b>		
Female	36 (52.9)	-
<b>Inclusion criteria</b>		
Amsterdam	28 (41.2)	-
Bethesda	40 (58.8)	-
<b>Age at first cancer diagnosis</b>		
	-	41 (19 - 81)
<b>Tumor site</b>		
Ascending colon	25 (36.8)	-
Transverse colon	7 (10.3)	-
Descending colon	4 (5.8)	-
Rectosigmoid colon	22 (32.4)	-
Endometrium	3 (4.4)	-
Colorectal, unspecified site	7 (10.3)	-

**Table 2:** Nuclear MSH6 expression status by IHC and available MSI results.

	<b>Loss of MMR protein expression.</b> <b>(IHQ) - N</b>	<b>MSI</b>
<i>MSH6</i>	6	1 MSI-H and 1 MSS *
<i>MSH6 + MSH2</i>	9	3 MSI-H and 1 MSS*
<i>MSH6 + MSH2 + MLH1 and/or PMS2</i>	3	3 MSI-H
<i>MSH6 + MLH1 and/or PMS2</i>	4	2 MSI-H and 1 MSS*

\* In the remaining tumors MSI analysis was not performed. MSI-H: High microsatellite instability. MSS: microsatellite stable.

**Table 3:** *MSH6* alterations identified in the 68 individuals analyzed.

Location	rs number	Substitution	Protein Effect	Pathogenicity			N (%)
				NCBI	LOVD	HGMD	
exon 1	rs1042821	c.116G>A	p.Gly39Glu	Benign	Benign	Benign	20 (29.4)
exon 1	rs1042820	c.186C>A	p.Arg62=	Benign	Benign	ND	18 (26.5)
intron 1	rs1800931	c.261-36A>G	-	Benign	Benign	ND	8 (11.8)
intron 1	rs55927047	c.260+22C>G	-	Benign	Benign	ND	17 (25.0)
exon 2	rs1800932	c.276A>G	p.Pro92=	Benign	Benign	ND	18 (26.5)
exon 2	rs3211299	c.431G>T	p.Ser144Ile	NC	Benign	VUS	1 (1.5)
intron 2	rs374618432	c.457+52_457+53delTGinsGTGA	-	NC	ND	ND	2 (2.4)
intron 2	rs3136282	c.457+52T>A	-	Benign	Benign	ND	29 (42.7)
intron 2	rs1800934	c.458-52G>T	-	Benign	Benign	ND	20 (29.4)
exon 3	rs1800935	c.540T>C	p.Asp180=	Benign	Benign	ND	35 (51.5)
intron 3	rs1800936	c.628-56C>T	-	Benign	Benign	ND	7 (10.8)
exon 4	rs1800937	c.642C>T	p.Tyr214=	Benign	Benign	VUS	7 (10.8)
exon 4	rs56371757	c.2272C>T	p.Leu758=	Benign	Benign	ND	1 (1.6)
exon 4	rs55708305	c.1164C>T	p.His388=	Benign	Benign	ND	1 (1.6)
exon 4	-	c.2006T>C	p.Ile669Thr	ND	VUS	ND	1 (1.6)
exon 4	-	c.719 G>A	p.Arg240Gln	ND	ND	ND	2 (3.1)
exon 5	rs2020910	c.3306T>A	p.Thr1102=	Benign	Benign	ND	2 (3.1)
intron 5	rs2020911	c.3438+14A>T	-	Benign	Benign	ND	40 (61.5)
intron 5	rs192614006	c.3439-16C>T	-	Benign	Benign	VUS	2 (2.4)
intron 6	rs267608104	c.3557-4_3557-3insT	-	Benign	ND	ND	9 (13.2)
intron 7	rs3136358	c.3646+35_3646+38delATCT	-	NC	ND	ND	15 (22.1)
exon 8	rs63750554	c.3772C>G	p.Gln1258Glu	NC	ND	ND	1 (1.5)
intron 8	rs3136367	c.3801+54C>G	-	Benign	ND	ND	47 (69.1)
intron 8	rs34154602	c.3802-44delT	-	NC	ND	ND	33 (48.5)
intron 9	rs267608137	c.4002-10delT	-	Benign	ND	ND	13 (19.1)
intron 9	rs267608138	c.4002-10dupT	-	NC	ND	ND	1 (1.6)

ND: not described. NC: not classified. VUS: Variant of uncertain significance.

**Table 4:** Results of *in silico* analysis of the three *MSH6* VUS.

Amino acid change	Polyphen	SIFT	PANTHER	SDM	HOPE	Mutation assessor
p.Ile669Thr	0.076	0.02	NA	This mutation is predicted to be stabilizing and non-disease-associated	Possibly damaging	Low
p.Arg240Gln	0.154	0.35	NA	This mutation is predicted to be stabilizing and non-disease-associated	Probably not damaging to the protein	Neutral
p.Gln1258Glu	0.001	0.79	-0.77734	NA	Possibly damaging	Low

**Polyphen** = 0: benign 1: pathogenic. **SIFT** < 0.05 pathogenic. **Panther** = 0:neutral -10:most likely to be deleterious (-3 is the previously identified cutoff point for functional significance). **Mutation assessor** = neutral' or 'low' are predicted to not impact protein function.

NA= Do not appear in most of the related sequences; as a result, substitutions at inserted positions are not generally likely to be deleterious.

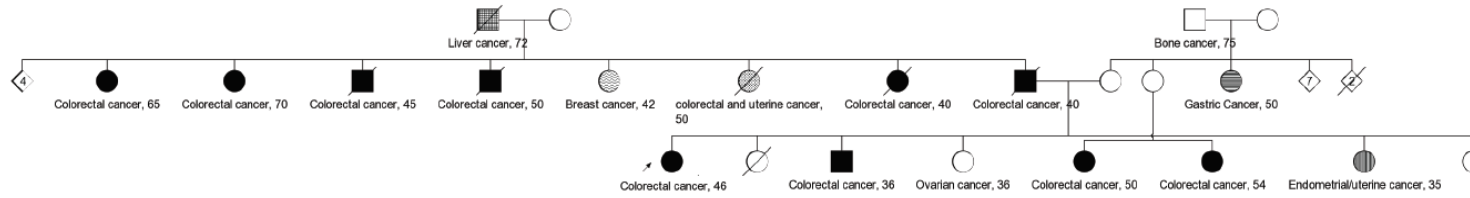
**Table 5:** Tumor characteristic of the three missense alterations with undefined pathogenic classification.

Substitution	Amino acid change	MSH6 domain (function)	Clinical information	IHC	MSI
c.2006T>C	p.Ile669Thr	II (connector)	CRC (left-sided) at age 38 years	WT	NA
c.719 G>A	p.Arg240Gln	N-terminal	CRC (right-sided) at age 46 years	lost MSH6	NA
			CRC (left-sided) at age 28 years	lost MSH6/MSH2	MSI-H
c.3772C>G	p.Gln1258Glu	V (ATPase)	CRC (left-sided) at age 36 years	lost MLH1	NA

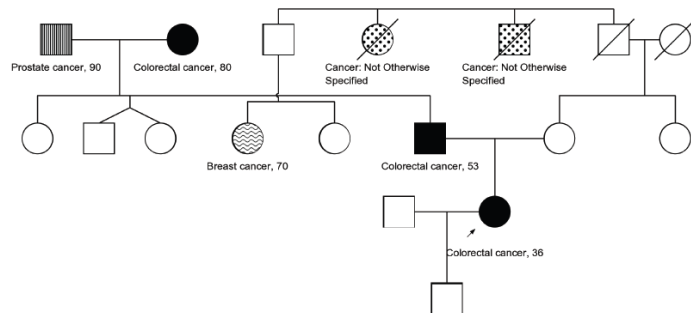
NA: not available. WT: normal expression of nuclear protein. MSI-H: High microsatellite instability.

**Figure S1:** Pedigrees of the four probands with *MSH6* VUS. In **A** and **D**, the c.719 G>A (p.Arg240Gln) alteration was identified. In **B**, the c.3772C>G (p.Gln1258Glu) alteration was identified. In **C**, the c.2006T>C (p.Ile669Thr) alteration was identified.

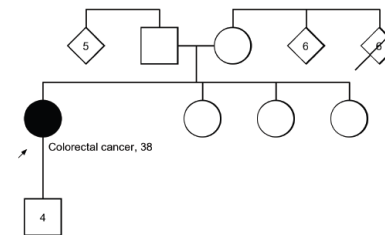
**A**



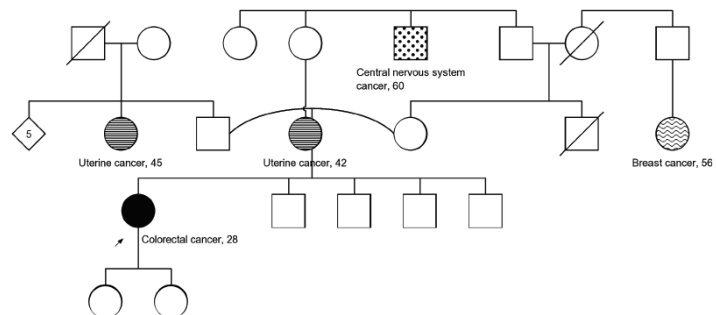
**B**



**C**



**D**



**LEGEND**

- Colorectal cancer
- ▨ Prostate cancer
- ◻ Cancer: Not Otherwise Specified
- ◻ Breast cancer
- ▨ Uterine cancer

## **CAPÍTULO 5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES**



A análise de mutações germinativas nos genes MMR é o principal processo de confirmação do diagnóstico clínico da Síndrome de Lynch. O espectro de mutações em cada um dos genes é variável, segundo uma revisão no banco de dados InSIGHT (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*), *MLH1* apresenta o maior número de variações não-sinônimas, e *MSH2* é responsável pelo maior número de rearranjos (grandes deleções e duplicações); sendo esse dois genes os que apresentam o maior número de alterações já descritas entre os genes MMR (Plazzer, 2013). Assim como o maior número de mutações ocorrem nos genes *MLH1* e *MSH2*, também são esses os genes responsáveis pelo maior número de pacientes com a Síndrome de Lynch e frequentemente são os mais estudados.

O gene *MSH6* apresenta a terceira maior proporção de alterações e tem uma frequência variável no número de pacientes diagnosticados com Síndrome de Lynch. Trabalhos publicados indicam uma variação de 5 a 26% de pacientes diagnosticados com mutações em *MSH6* (Peltomäki, 2004; Roncari, 2007; Nilbert, 2009; Sjursen, 2010; Engel, 2012). Nesse trabalho não foram identificadas mutações patogênicas em *MSH6*, embora tenham sido observadas 26 alterações, algumas ainda sem classificação de patogenicidade, e portanto classificadas como VUS (*Variant of uncertain significance*). Esse é a primeira pesquisa brasileira direcionada ao gene *MSH6*, com avaliação da expressão protéica por imunohistoquímica, pesquisa de instabilidade de microssatélites e também de rearranjos nesse gene.

Embora o diagnóstico preciso da Síndrome de Lynch seja feito pelo sequenciamento do DNA, as técnicas de imunohistoquímica e de instabilidade de microssatélites são usadas para o rastreamento da síndrome, sendo que o resultado da imunohistoquímica pode direcionar a pesquisa de mutações nos genes MMR. Ambos os testes são importantes, pois um pode detectar casos que não são identificados pelo outro, por exemplo, no caso da IMS detectar alterações que não são percebidas pelos anticorpos usados na IHQ. Por outro lado, a IHQ pode ser muito importante para indicar mutações em *MSH6*, já que esses tumores costumam não apresentar alta frequência de IMS (Shia, 2008). A sensibilidade e especificidade da IHQ em detectar mutações em *MSH6* são de 83% e 88%, respectivamente (Palomaki, 2009).

Dos casos avaliados neste estudo, 22 (33,8%) apresentaram perda da expressão nuclear da proteína MSH6. Destes, 12 (54,5%) também apresentaram perda de MSH2. A perda da expressão protéica de MSH6 pode ser explicada por uma alteração em *MSH2*, pois

MSH2 é parceiro obrigatório de MSH6 na formação do complexo de heterodímero que atua no processo de reparo. Assim, mutações em *MSH2* resultam na perda de expressão de MSH2 e MSH6, enquanto mutações em *MSH6* levam a perda de expressão apenas de MSH6. Outras proteínas, como MSH3, podem compensar a perda de MSH6 e estabilizar MSH2. Essa redundância de funções entre MSH3 e MSH6 também explica porque mutações em *MSH6* são relacionadas à baixa IMS, já que MSH3 é capaz de atuar de forma semelhante ao MSH6 no processo de reparo, mesmo com mutações em *MSH6*, o dímero MSH3/MSH2 é funcional.

A avaliação de *MSH2* nos 68 pacientes incluídos nesse estudo, feita por outro grupo (dados não publicados), mostrou que dos 22 tumores que apresentaram perda da expressão de MSH6, oito (36,4%) foram diagnosticados com mutações em *MSH2* (duas deleções diagnosticadas por MLPA e seis mutações de ponto). Esse resultado mostra a importância da avaliação de *MSH2* sempre que a IHQ indicar perda de expressão em MSH6.

A técnica de MLPA foi utilizada para detectar grandes deleções e duplicações que não podem ser detectadas por sequenciamento convencional, entre os 68 pacientes avaliados, três (4,4%) apresentaram uma deleção que inclui o éxon 1 de *MSH2* e éxons do gene *EPCAM*, localizado a cerca de 16kb anterior ao *MSH2*. As sondas presentes no kit de MLPA utilizado indicam que a deleção abrange sete dos nove éxons de *EPCAM*.

Nesse trabalho, assim como nos bancos de dados pesquisados, a maioria das alterações em *MSH6* é de substituições, dentre elas, apenas cinco são não-sinônimas e três não possuem uma classificação definida quanto à patogenicidade (c.2006T>C, c.3772C>G, c.719 G>A). Para essas variantes foram utilizados seis preditores: SIFT, Mutation assessor, Panther, SDM, HOPE e PolyPhen para análise da patogenicidade. Esses preditores são algoritmos que utilizam diferentes parâmetros de avaliação para obter um *score* final que indica a probabilidade das alterações causarem dano à proteína, e, conseqüentemente, serem patogênicas. Basicamente, a predição da patogenicidade é baseada na conservação da sequência, através da análise comparativa de várias sequências do gene de interesse em diferentes espécies; nas anotações de sequência, através da avaliação de sítios de ligação a outras proteínas, íons ou DNA; ou então nas características estruturais da proteína, por meio da comparação entre a estrutura cristalográfica selvagem e a mutada. Dependendo dos parâmetros avaliados, nem sempre os resultados são concordantes entre os diferentes preditores.

A variante c.719G>A (Arg240Gln) mostrou-se não patogênica por todos os preditores, essa variante foi encontrada em apenas dois pacientes, de regiões diferentes do

país (São Paulo e Belém), ambos com perda de expressão de MSH6. Apesar de esse éxon possuir uma mutação já conhecida, que leva a formação de uma proteína truncada (c.718 C>T/ p.Arg240X), a mutação encontrada nesse trabalho ainda não está descrita nos bancos de dados LOVD, NCBI e HGMD. Nenhum dos preditores *in silico* indicou patogenicidade dessa variante mesmo com a mudança de carga e tamanho indicado pelo HOPE (o aminoácido mutante apresenta carga neutra, enquanto o selvagem era positivo e maior).

A variante c.2006T>C (Ile669Thr) foi encontrada em apenas um paciente, apesar da IHQ não ter indicado perda de expressão de proteína, essa alteração mostrou-se patogênica por dois preditores, SIFT e HOPE. Enquanto o SIFT avalia a patogenicidade pela conservação do aminoácido mutado através do alinhamento de várias sequências, o HOPE faz uma avaliação estrutural da proteína combinando informações de várias fontes e identificou uma diferença de tamanho e hidrofobicidade como possíveis causas para mudanças de interação do MSH6 com outras moléculas, e que podem determiná-la como uma variante patogênica.

A terceira variante avaliada com os preditores, c.3772C>G (p.Gln1258Glu), também encontrada em apenas um indivíduo, tem patogenicidade indentificada apenas pelo HOPE. O programa detectou mudança na carga do aminoácido de neutra para negativa devido à troca da glutamina pelo ácido glutâmico, o que pode ocasionar alterações no dobramento da proteína. Os outros preditores não a classificaram como patogênica por avaliarem outros parâmetros, como por exemplo, o fato dela estar em uma posição não conservada do gene, o que significa que a comparando com sequências homólogas outros aminoácidos podem ser encontrados na mesma posição, ou seja, ela suporta certa variação.

Uma avaliação mais completa dessas variantes, especialmente das duas que mostraram resultados discordantes entre os preditores utilizados (c.2006T>C e c.3772C>G) seria adequada para a correta classificação quanto à patogenicidade. Análises funcionais e a pesquisa dessas variantes em indivíduos que não apresentam Síndrome de Lynch são alternativas consideráveis, além de outras análises *in silico* que ainda podem auxiliar nesse sentido.

Apesar de trabalhos anteriores relatarem uma porcentagem mínima de 5% de casos da Síndrome de Lynch atribuídos ao *MSH6*, nesse trabalho não foi identificado nenhum indivíduo com mutação comprovadamente patogênica nesse gene. Esse resultado pode ser decorrente do tamanho amostral ou até mesmo dos critérios de inclusão dos indivíduos, como já apontado pelo trabalho de Sjursen (2010), os critérios clínicos de Amsterdam e Bethesda, usados para identificação clínica de indivíduos com de Síndrome de Lynch, parecem são ser

adequados para identificar portadores de mutações em *MSH6*. Em outro estudo brasileiro, que incluiu um número semelhante de casos (n=88) para sequenciamento dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, também não foi encontrada nenhuma mutação em *MSH6* (Monteiro Santos e cols., 2012).

O fato de 32,4% dos tumores apresentarem perda da expressão em *MSH6* e não ter sido identificada a alteração que levou a esse perfil, exceto nos oito pacientes em que foram detectadas mutações em *MSH2*, mostra que outros fatores devem estar atuando na expressão de *MSH6*. Entre eles podem ser considerados fatores epigenéticos, heterogenidade tumoral, problemas na execução da técnica e até mesmo interpretação dos resultados.

Considerando que 36,4% dos tumores com perda da expressão em *MSH6* são explicados por *MSH2*, percebe-se que nem sempre a IHQ é suficiente para um direcionamento correto de posterior análise gênica, principalmente para o gene *MSH6*, já que sua expressão é fortemente dependente de *MSH2*. Esse resultado corrobora com o fato que na ausência de expressão de *MSH6* a análise de *MSH2* deve ser realizada.

Essas especificidades em relação à interpretação dos resultados de IHQ são de grande importância, já que tem uma repercussão prática especialmente em relação às estratégias usadas para o diagnóstico molecular, e devem ser avaliadas sempre com muita precaução.

A avaliação de um número maior de pacientes brasileiros com suspeita de Síndrome de Lynch seria necessária para uma caracterização mais exata do perfil de alterações do gene *MSH6*, assim como de sua frequência, em nossa população. Embora com os resultados desse trabalho se tenha uma indicação de que esse gene seja responsável por uma parcela muito pequena de indivíduos com a Síndrome, e não identificada por nossas análises.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aaltonen LA, Salovaara R, Kristo P et al. (1998) Incidence of hereditary nonpolyposis colorectal cancer and the feasibility of molecular screening for the disease. *N Engl J Med* 21:1481-1487.
- Acharya S, Wilson T, Gradia S, Kane MF, Guerrette S, Marsischky GT, Kolodner R, Fishel R (1996) hMSH2 forms specific mismatch-binding complexes with hMSH3 and hMSH6. *Proc Natl Acad Sci U S A* 24:13629-34.
- Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y (1997) Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 18:3920-3.
- Alani E (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* Msh2 and Msh6 proteins form a complex that specifically binds to duplex oligonucleotides containing mis-matched DNA base pairs. *Mol. Cell. Biol* 16:5604–5615.
- Baglietto L, Lindor NM, Dowty JG, et al. (2009) Risks of Lynch syndrome cancer for MSH6 mutation carriers. *J Natl Cancer Inst* 102:193–201
- Berends MJW, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RGJ, Van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, De Vries EGE, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CHCM, Van der Zee AGJ, Hofstra RMW, Kleibeuker JH (2002) Molecular and clinical characteristics of MSH6 variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 70:26–37.
- Boland R, Lynch H (2013) The History of Lynch Syndrome. *Fam Cancer* 2:145–157.
- Boland R, Shike M (2010) Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 7:2197.
- Bonis PA, Trikalinos TA, Chung M, Chew P, Ip S, DeVine D, Lau J (2007) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Diagnostic Strategies and their implications. *Evid Rep Technol Assess* 150:1-180.
- Cossio SL, Koehler-Santos P, Pessini SA, Mónico H, Edelweiss MI, Meurer L, Errami A, Coffa J, Bock H, Saraiva-Pereira ML, Ashton-Prolla P, Prolla JC (2010) Clinical and histomolecular endometrial tumor characterization of patients at-risk for Lynch syndrome in South of Brazil. *Fam Cancer* 2:131-9.
- da Silva FC, de Oliveira LP, Santos EM, Nakagawa WT, Aguiar Junior S, Valentin MD, Rossi BM, de Oliveira Ferreira F (2010) Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. *Fam Cancer* 4:563-70.
- Drummond JT, Li GM, Longley MJ, Modrich P (1995) Isolation of an hMSH2-p160 heterodimer that restores DNA mismatch repair to tumor cells. *Science* 268:1909–1912.

- Engel C, Loeffler M, Steinke V, et al (2012) Risks of less common cancers in proven mutation carriers with Lynch syndrome. *J Clin Oncol* 30:4409–15.
- Fearon E (2011) Molecular genetics of colorectal cancer, *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis* 6:479–507.
- Gradia S, Acharya S, Fishel R (1997) The Human Mismatch Recognition Complex hMSH2-hMSH6 Functions as a Novel Molecular Switch. *Cell* 91: 995–1005.
- Hegde M, Blazo M, Chong B, Prior T, Richards C (2005) Assay validation for identification of hereditary nonpolyposis colon cancer-causing mutations in mismatch repair genes MLH1, MSH2, and MSH6. *J Mol Diagn* 4:525-34.
- Hendriks YMC, Wagner A, Morreau H, Menko F, Stormorken A, Quehenberger F, Sandkuijl L, Møller P, Genuardi M, Van Houwelingen H, Tops C, Van Puijenbroek M, Verkuijlen P, Kenter G, Van Mil A, Meijers-Heijboer H, Tan GB, Breuning MH, Fodde R, Wijnen JT, Bröcker-Vriends AHJT, Vasen H (2004). Cancer risk in hereditary nonpolyposis colorectal cancer due to MSH6 mutations: impact on counseling and surveillance. *Gastroenterology* 127:17–25.
- Huxley RR, Ansary-Moghaddam A, Clifton P, Czernichow S, Parr CL, Woodward M (2009) The impact of dietary and lifestyle risk factors on risk of colorectal cancer: a quantitative overview of the epidemiological evidence. *Int. J. Cancer* 125:171–80
- Hsieh P, Yamane K (2008) DNA mismatch repair: molecular mechanism, cancer, and ageing. *Mech Ageing Dev* 7-8:391-407.
- Ionov Y, Peinado MA, Malkhosyan S, Shibata D, Perucho M (1993) Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. *Nature* 363:558-561.
- Iyer RR, Pluciennik A, Burdett V, Modrich PL (2006) DNA mismatch repair: functions and mechanisms. *Chem Rev* 2:302-23.
- Jenkins MA (2009) Role of MSH6 and PMS2 in the DNA mismatch repair process and carcinogenesis. *Surg Oncol Clin N Am* 4:625-36.
- Kámory E, Kolacsek O, Ottó S, Csuka O. (2003) hMLH1 and hMSH2 somatic inactivation mechanisms in sporadic colorectal cancer patients. *Pathol Oncol Res*4:236-241.
- Kastrinos F, Mukherjee B, Tayob N, et al (2009) Risk of pancreatic cancer in families with Lynch syndrome. *JAMA* 302:1790–5.
- Kim HC, Kim CN, Yu CS, Roh AS, Kim JC (2003) Methylation of the hMLH1 and hMSH2 promoter in early-onset sporadic colorectal carcinomas with microsatellite instability. *Int J Colorectal Dis.*18:196-202.
- Kleczkowska HE, Marra G, Lettieri T, Jiricny J (2001) hMSH3 and hMSH6 interact with PCNA and colocalize with it to replication foci. *Genes Dev.* 15:724–736.

- Koehler-Santos P, Izetti P, Abud J, Pitroski CE, Cossio SL, Camey SA, Tarta C, Damin DC, Contu PC, Rosito MA, Ashton-Prolla P, Prolla JC (2011) Identification of patients at-risk for Lynch syndrome in a hospital-based colorectal surgery clinic. *World J Gastroenterol* 6:766-73.
- Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [Updated 2014 May 22]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2015.
- Kolodner RD, Tytell JD, Schmeits JL, Kane MF, Gupta RD, Weger J, Wahlberg S, Fox EA, Peel D, Ziogas A, Garber JE, Syngal S, Anton-Culver H, Li FP (1999) Germ-line msh6 mutations in colorectal cancer families. *Cancer Res* 59:5068–5074
- Kouraklis G, Misiakos EP (2005) Hereditary non-polyposis colorectal cancer (Lynch Syndrome): criteria for identification and management. *Digestive Diseases and Sciences* 50:336-44.
- Kovacs ME, Papp J, Szentirmay Z, et al. (2009) Deletions removing the last exon of TACSTD1 constitute a distinct class of mutations predisposing to Lynch syndrome. *Hum Mutat* 30:197–203.
- Kunkel TA, and Erie DA (2005) DNA mismatch repair. *Annu. Rev. Biochem* 74:681–710.
- Laguri C, Duband-Goulet I, Friedrich N, Axt M, Belin P, Callebaut I, Gilquin B, Zinn-Justin S, Couprie J (2008) Human mismatch repair protein MSH6 contains a PWWP domain that targets double stranded DNA. *Biochemistry* 47:6199–6207.
- Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, Li GM (2013) The Histone Mark H3K36me3 Regulates Human DNA Mismatch Repair through its Interaction with MutS $\alpha$  *Cell* 3: 590–600.
- Ligtenberg MJ, Kuiper RP, Chan TL, Goossens M, Hebeda KM, Voorendt M, Lee TY, Bodmer D, Hoenselaar E, Hendriks-Cornelissen SJ, Tsui WY, Kong CK, Brunner HG, van Kessel AG, Yuen ST, van Krieken JH, Leung SY, Hoogerbrugge N (2009) Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. *Nat Genet* 41:112–17.
- Lindor NM, Rabe K, Petersen GM, et al. (2005) Lower cancer incidence in msterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency: familial colorectal cancer type X. *JAMA* 16:1979–1985.
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, et al. (1993) Genetics, natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an update review. *Gastroenterology* 5:1535-49.
- Matton N, Simonetti J, Williams KJ (2000) Identification of mismatch repair protein complexes in HeLa nuclear extracts and their interaction with heteroduplex DNA. *J. Biol. Chem* 275:17808–17813.

- Marra G, Iaccarino I, Lettieri T, Roscilli G, Delmastro P, Jiricny J (1998) Mismatch repair deficiency associated with overexpression of the MSH3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 5:8568–8573.
- Martin A & Scharff MD (2002) AID and mismatch repair in antibody diversification. *Nature Reviews Immunology* 2, 605-614
- Mecklin JP, Järvinen HJ, Hakkiluoto A, Hallikas H, Hiltunen KM, Härkönen N, Kellokumpu I, Laitinen S, Ovaska J, Tulikoura J, et al (1995) Frequency of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. A prospective multicenter study in Finland. *Dis Colon Rectum* 6: 588-93.
- Miyaki M, Konishi M, Tanaka K, Kikuchi-Yanoshita R, Muraoka M, Yasuno M, Igari T, Koike M, Chiba M, Mori T (1997) Germline mutation of MSH6 as the cause of hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Nat Genet* 3:271-2.
- Monteiro Santos EM, Valentin MD, Carneiro F, de Oliveira LP, de Oliveira Ferreira F, Junior SA, Nakagawa WT, Gomy I, de Faria Ferraz VE, da Silva Junior WA, Carraro DM, Rossi BM (2012) Predictive models for mutations in mismatch repair genes: implication for genetic counseling in developing countries. *BMC Cancer*. 12:64.
- Nilbert M, Wikman FP, Hansen TVO, Krarup HB, Orntoft TF, Nielsen FC, Sunde L, Gerdes A-M, Cruger D, Timshel S, Bisgaard M-L, Bernstein I, Okkels H (2009) Major contribution from recurrent alterations and MSH6 mutations in the Danish Lynch syndrome population. *Fam Canc* 8:75–83.
- Oliveira Ferreira F, Napoli Ferreira CC, Rossi BM, Toshihiko Nakagawa W, Aguilar S Jr, Monteiro Santos EM, Vierira Costa ML, Lopes A (2004) Frequency of extra-colonic tumors in hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) and familial colorectal cancer (FCC) Brazilian families: An analysis by a Brazilian Hereditary Colorectal Cancer Institutional Registry. *Fam Cancer* 1:41-7.
- Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN (2009) EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. *Genet Med* 11:42-65
- Palombo F, Iaccarino I, Nakajima E, Ikejima M, Shimada T, Jiricny J (1996) hMutSb, a heterodimer of hMSH2 and hMSH3, binds to insertion/deletion loops in DNA. *Curr Biol* 6:1181–1184.
- Peltomäki P, Vasen H (2004) Mutations associated with HNPCC predisposition - Update of ICG-HNPCC/INSiGHT mutation database. *Dis Markers* 20:269–276.
- Plaschke J, Engel C, Kruger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, Moeslein G, Schulmann K, Gebert J, Von Knebel Doeberitz M, Ruschoff J, Loeffler M, Schackert HK (2004) Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MSH2 mutations: the German Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Consortium. *J Clin Oncol* 22:4486–4494.



- Plazzer JP, Sijmons RH, Woods MO, Peltomäki P, Thompson B, Den Dunnen JT, Macrae F (2013) The InSiGHT database: utilizing 100 years of insights into Lynch syndrome. *Fam Cancer* 12:175-80.
- Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, et al. (1997) A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: Meeting highlights and Bethesda guidelines. *J. Natl. Cancer Inst* 89:1758–1762
- Roncari B, Pedroni M, Maffei S, Di Gregorio C, Ponti G, Scarselli A, Losi L, Benatti P, Roncucci L, De Gaetani C, Camellini L, Lucci-Cordisco E, Tricarico R, Genuardi M, Ponz de Leon M (2007) Frequency of constitutional MSH6 mutations in a consecutive series of families with clinical suspicion of HNPCC. *Clin Genet* 3:230-7.
- Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC, Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ (2002) hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 6:555-61.
- Shia J (2008) 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* 4:293-300.
- Szadkowski M, Jiricny J (2002) Identification and functional characterization of the promoter region of the human MSH6 gene. *Genes Chromosomes Cancer* 1:36-46.
- Samadder NJ, Jasperson K, Burt RW (2014) Hereditary and Common Familial Colorectal Cancer: Evidence for Colorectal Screening. *Dig Dis Sci*. Dec 12.
- Sehgal R, Sheahan K, O'Connell PR, Hanly AM, Martin ST, Winter DC (2014) Lynch syndrome: an updated review. *Genes (Basel)* 3:497-507.
- Schlussel AT, Gagliano RA Jr, Seto-Donlon S, Eggerding F, Donlon T, Berenberg J, Lynch HT (2014) The evolution of colorectal cancer genetics-Part 1: from discovery to practice. *J Gastrointest Oncol* 5:326-335
- Sjursen W, Haukanes BI, Grindedal EM, Aarset H, Stormorken A, Engebretsen LF, Jonsrud C, Bjørnevoll I, Andresen PA, Ariansen S, Lavik LAS, Gilde B, Bowitz-Lothe IM, Mæhle L, Moller P (2010) Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers *J Med Genet* 9: 579–585
- Terui H, Akagi K, Kawame H, Yura K (2013) CoDP: predicting the impact of unclassified genetic variants in MSH6 by the combination of different properties of the protein. *J Biomed Sci* 20:25.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D (1993) Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 260:816-819.

- Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, et al. (2004) Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *J. Natl.Cancer Inst* 96:261–68.
- Umar A, Risinger JI, Glaab WE, Tindall KR, Barrett JC, Kunkel TA (1998) Functional overlap in mismatch repair by human MSH3 and MSH6. *Genetics* 148:1637–1646.
- Vasen HFA, Mecklin JP, Meera Khan P, Lynch HT (1991) The International Collaborative Group on hereditary nonpolyposis colorectal cancer (ICG-HNPCC). *Dis Col Rectum* 34:424-5.
- Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT (1999) New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. *Gastroenterology* 116:1453–1456
- Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K et al. (2013) Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut*. Jun;62(6):812-23.
- Warren JJ, Pohlhaus TJ, Changela A, Iyer RR, Modrich PL, Beese LS (2007) Structure of the human MutS $\alpha$  DNA lesion recognition complex. *Mol Cell* 4:579-92.
- Wang Y, Friedl W, Lamberti C, et al. (2003) Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. *Int J Cancer* 103:636–41.
- Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, et al. (1998) MSH2 genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet*;20:326–8.
- Wimmer K, Etzler J (2008) Constitutional mismatch repair-deficiency syndrome: have we so far seen only the tip of an iceberg? *Hum Genet*2:105-22.
- Woods MO, Williams P, Careen A, Edwards L, Bartlett S, McLaughlin JR, Younghusband HB (2007) A new variant database for mismatch repair genes associated with Lynch syndrome. *Hum Mutat* 28:669–673.
- Wu Y, Berends MJW, Mensink RGJ, Kempinga C, Sijmons RH, van der Zee AGJ, Hollema H, Kleibeuker JH, Buys CHCM, Hofstra RMW (1999) Association of hereditary nonpolyposis colorectal cancer-related tumors displaying low microsatellite instability with MSH6 germline mutations. *Am J Hum Genet* 65:1291–1298
- Zauber AG, Winawer SJ, O'Brien MJ, et al. (2012) Colonoscopic polypectomy and long-term prevention of colorectal-cancer deaths. *N Engl J Med* 366: 687–696.

Sites:

INCa: Estimativa 2014. Incidência de câncer no Brasil.  
<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/> (Dezembro, 2014).

## **ANEXO 1 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)**

### **“Diagnóstico clínico e laboratorial da Síndrome de Lynch: um estudo de custo-efetividade e de viabilidade de implantação no SUS”**

Patricia Ashton-Prolla (HCPA), Fernando Regla Vargas (INCA), Maria Isabel Achatz (HACC), Paulo Assumpção (HUJBB), Benedito Mauro Rossi (HCB) e colaboradores.

Um consórcio de pesquisadores e Hospitais Brasileiros, está realizando um estudo sobre a eficácia, o custo e o impacto do diagnóstico de câncer de cólon (intestino) em indivíduos Brasileiros. Serão convidados a participar pacientes com câncer colorretal atendidos em qualquer um de cinco hospitais participantes (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, INCA no Rio de Janeiro, Hospital AC Camargo em São Paulo, Hospital Universitário João de Barros Barreto em Belém do Pará, e Hospital do Câncer de Barretos). O estudo pretende avaliar as características pessoais e familiares da pessoa e sua relação com alterações em diferentes testes laboratoriais que poderão afirmar se o câncer de intestino em uma determinada pessoa tem origem hereditária ou genética. Serão estudados alguns marcadores genéticos nos tumores de intestino (a partir do estudo do bloco de parafina que contem o tecido tumoral retirado em cirurgia) que incluem os assim chamados exames de rastreamento do câncer de intestino genético (instabilidade de microssatélites, mutações no gene BRAF, imunohistoquímica, metilação de promotor). Além disso, serão realizados testes para verificar se há alterações genéticas (mutações) que podem causar o câncer de intestino (rearranjos genômicos, mutações em genes de reparo e mutações em outros genes que causam o câncer de intestino). Estes últimos estudos geralmente são realizados no material genético (DNA) retirado das células do sangue periférico (mediante coleta de sangue). Em resumo, os resultados deste estudo poderão trazer mais informações sobre a influência de fatores genéticos no tratamento de tumores de intestino.

Você está sendo convidado a participar deste estudo e isso envolve consultar com médico(a) geneticista e/ou um membro da equipe de pesquisa devidamente qualificado. Na ocasião, ele(a) vai lhe fazer perguntas sobre a sua história médica e familiar. Se você desejar participar, fará leitura e assinatura de um termo de consentimento livre e esclarecido, será submetido a uma coleta de sangue para extração e análise de DNA (seu material genético) e responderá a alguns questionários. Além disso, você vai fornecer uma autorização para que possamos estudar uma amostra de seu tumor de intestino, que será retirada de blocos de parafina e/ou do material cirúrgico fresco que ficaram guardados no laboratório de patologia desde a sua cirurgia do intestino. Se porventura os resultados deste estudo inicial mostrarem um risco maior para câncer hereditário de intestino, você e seus familiares serão convidados para uma nova consulta de aconselhamento genético em que os resultados da pesquisa lhe serão fornecidos e lhe serão transmitidas informações sobre recomendações de cuidados médicos e de prevenção.

Você pode escolher se quer ou não participar do estudo. Se você decidir que não quer participar, isso não vai afetar de maneira nenhuma o seu atendimento futuro. Se você quiser participar, uma pessoa da equipe de pesquisa estará à sua disposição para esclarecer dúvidas. O resultado desse estudo será importante para que possamos entender melhor como se comportam os tumores de intestino hereditários. Essa informação poderá nos ajudar a acompanhar e tratar melhor as pessoas em risco para este tipo de câncer.

Se você quer participar do estudo, por favor assine este documento. As informações dessa pesquisa serão utilizadas somente pela equipe de saúde. Em caso de publicação, os dados desse estudo serão utilizados de forma anônima. Muito obrigada por sua atenção.

### DOCUMENTAÇÃO DE CONSENTIMENTO:

1. Declaro ter sido esclarecido sobre a garantia de receber resposta a qualquer pergunta sobre procedimentos, riscos, benefícios ligados à pesquisa 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 nenhuma 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. Autorizo o armazenamento da amostra de meu DNA, obtido nesse projeto de pesquisa, para utilização futura.

**SIM**

**NÃO**

6. Autorizo a utilização de minha amostra de DNA caso surjam novos estudos sobre marcadores genéticos do câncer de intestino no futuro.

**SIM**

**NÃO**

7. Declaro estar ciente de que não há prazo exato ou estipulado para receber resposta do resultado desta pesquisa, mas que este será informado assim que disponível.

**SIM**

**NÃO**

8. Estou ciente de que posso optar por não saber o resultado do teste quando este estiver disponível.

**SIM**

**NÃO**

9. Em caso de impossibilidade de receber o resultado pessoalmente, autorizo meu/minha familiar, Sr./Sra. \_\_\_\_\_ a recebê-lo.

10. Eu expliquei a \_\_\_\_\_ os objetivos, riscos, benefícios e procedimentos necessários para esta pesquisa, na minha melhor capacidade.

\_\_\_\_\_  
**Assinatura do entrevistador**

\_\_\_\_\_  
**Nome por extenso**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

Eu li e recebi uma cópia deste formulário de consentimento. Eu concordo em realizar a análise genética 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.

\_\_\_\_\_  
**Nome e assinatura do participante**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

\_\_\_\_\_  
**Data de nascimento**

\_\_\_\_\_  
**Testemunha**

\_\_\_\_\_  
**Local e Data**

Pesquisadores responsáveis: Dra. Patricia Ashton-Prolla (HCPA, Porto Alegre) tel.: (51) 3359-7661; Dr. Fernando Regla Vargas (INCA, Rio de Janeiro) tel.: (21) 32331460; Dra. Maria Isabel Achatz (HACC, São Paulo) tel.: (21) 21895228; Dr. Paulo Assumpção (HUJBB, Belém do Pará) tel.: (91) 3225-1970; Dr. Benedito Mauro Rossi (HCB, Barretos) tel.: (17) 33216600.