

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

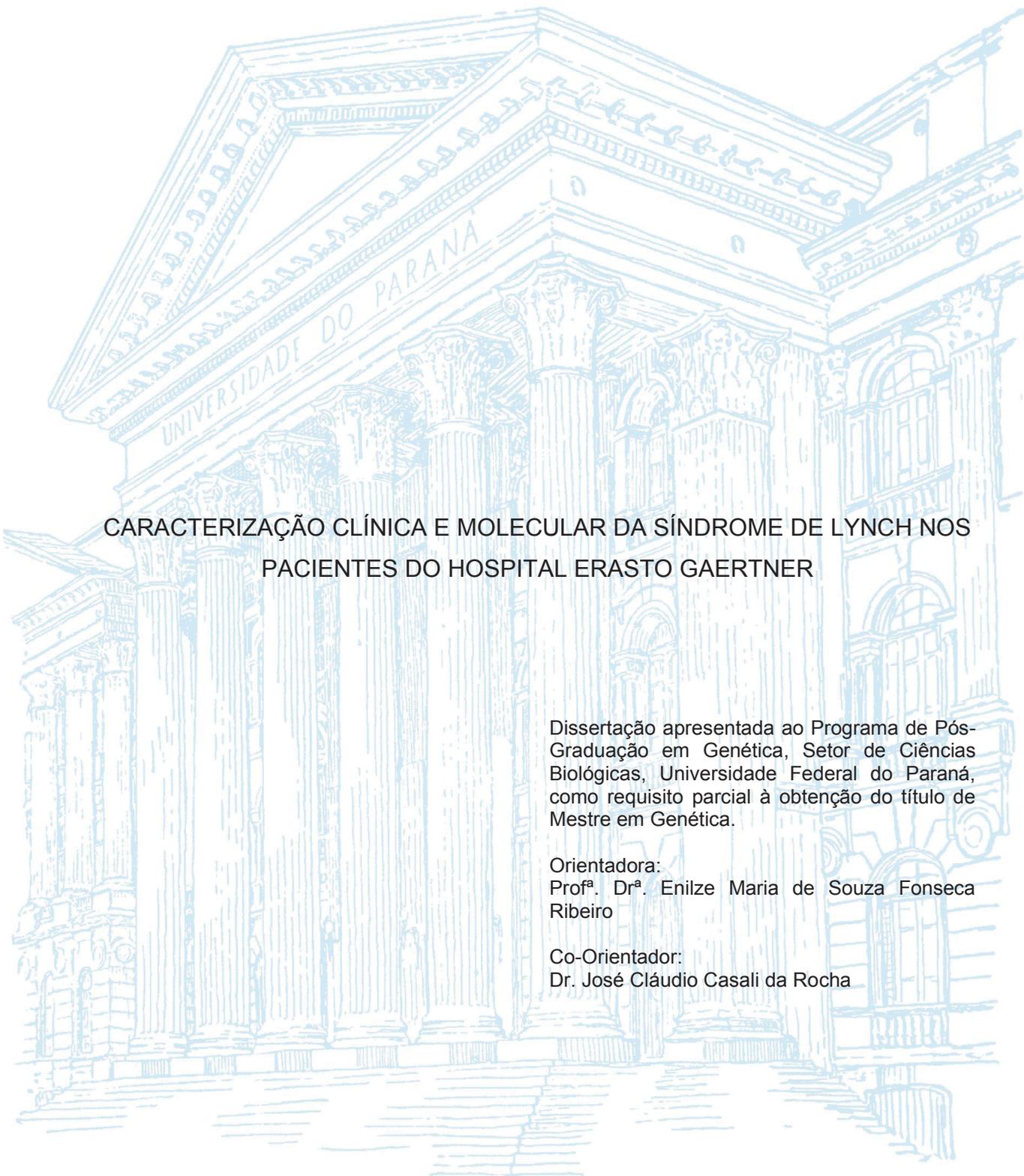
VANESSA NASCIMENTO KOZAK

CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA SÍNDROME DE LYNCH NOS
PACIENTES DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER

CURITIBA

2020

VANESSA NASCIMENTO KOZAK



CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA E MOLECULAR DA SÍNDROME DE LYNCH NOS
PACIENTES DO HOSPITAL ERASTO GAERTNER

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Genética.

Orientadora:
Prof^ª. Dr^ª. Enilze Maria de Souza Fonseca
Ribeiro

Co-Orientador:
Dr. José Cláudio Casali da Rocha

CURITIBA

2020

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas
(Giana Mara Seniski Silva – CRB/9 1406)

Kozak, Vanessa Nascimento

Caracterização clínica e molecular da Síndrome de Lynch nos pacientes do Hospital Erasto Gaertner. / Vanessa Nascimento Kozak. – Curitiba, 2020.

118 p.: il.

Orientadora: Enilze Maria de Souza Fonseca
Coorientadore: José Cláudio Casali da Rocha

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Neoplasias colorretais hereditárias sem polipose. 2. Diagnóstico molecular. 3. Sistema Único de Saúde. I. Título. II. Fonseca, Enilze Maria de Souza. III. Rocha, José Cláudio Casali da. IV. Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

CDD (22. ed.) 616.075



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO GENÉTICA -
40001016006P1

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em GENÉTICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **VANESSA NASCIMENTO KOZAK** intitulada: **Caracterização Clínica e molecular da síndrome de Lynch nos pacientes do Hospital Erasto Gaertner**, sob orientação da Profa. Dra. ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 13 de Março de 2020.

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 10:32:21.0

ENILZE MARIA DE SOUZA FONSECA RIBEIRO
Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

12/05/2020 09:31:30.0

GIOVANA TARDIN TORREZAN
Avaliador Externo (FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE - HOSPITAL A.
C. CAMARGO)

Assinatura Eletrônica

03/04/2020 10:20:02.0

DANIELLE MALHEIROS FERREIRA
Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

18/05/2020 11:47:31.0

VIRGINIA MARIA COSER
Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA)

Setor de Ciências Biológicas, Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-1587 - E-mail: ppg-gen@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 39180

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 39180

AGRADECIMENTOS

Agradeço conjuntamente, em primeiro lugar, aos meus pais e ao meu então namorado Guilherme, por terem me apoiado a dar – e possibilitado que eu desse – aquele que seria o meu primeiro passo rumo ao contato apaixonante com o câncer hereditário: o *fellowship* em Cleveland-Ohio em 2015.

Agradeço ao meu pai, professor, engenheiro, eterno estudioso, movido à razão – por sempre ter me estimulado a estudar mais, “porque tirar dez não é mais que a obrigação”; agradeço à minha mãe, cuca-fresca, aluna da vida, movida à coração – por sempre ter me estimulado a estudar menos, “porque desse jeito você vai acabar queimando todos os neurônios dessa caixola, filhinha”. Acho que chegamos num equilíbrio bom.

Agradeço ao meu agora marido Guilherme, que mesmo sem entender exatamente “que história é essa de Genética agora?” sempre apoiou incondicionalmente minhas escolhas e viabilizou tudo na nossa vida para que esse Mestrado pudesse ocorrer com a maior dedicação possível.

Agradeço imensamente ao Dr. James Church, diretor do Centro Sanford R. Weiss para Câncer Colorretal Hereditário da *Cleveland Clinic*, meu preceptor durante o *fellowship*, por ter um coração do tamanho do mundo; por exercer sua profissão com tamanho amor e entusiasmo; pela bondade em me ensinar tanto sobre câncer colorretal hereditário e dessa forma me contagiar com sua paixão pelo assunto. Agradeço também à Brandie Leach, do departamento de Aconselhamento Genético (AG) da Cleveland Clinic, por ter me recebido no seu consultório e se preocupado em me fazer entender cada um dos casos; por ter me indicado meu primeiro livro em AG – *Counseling about cancer*.

Agradeço ao Dr. José Cláudio Casali, por ter aberto as portas do serviço de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner quando voltei para o Brasil, permitindo tanto aprendizado com tantos diferentes casos; pela coorientação nesse trabalho.

Agradeço à Dra. Enilze Ribeiro, por ter acreditado no (improvável) interesse de uma cirurgiã em Genética, desde o primeiro momento, mesmo sem me conhecer; por ter me mostrado o caminho das pedras (ou das ervilhas) para que eu pudesse me preparar para a seleção da pós-graduação depois de tanto tempo sem contato com a Genética clássica; pela orientação, por me encorajar e ajudar a vencer as minhas frustrações durante toda a jornada.

Agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Genética da UFPR e a todos os professores com quem tive oportunidade de aprender, desde o (brilhante) ReMendel até as disciplinas ministradas, pela excelência e profissionalismo. Tenho muito orgulho de ter participado desse programa. Um agradecimento especial aos professores Dr. Iglénir, Dra. Jaque e Dra. Dani Grádia – obrigada pela carona na cauda desse (ensaio) cometa.

Às amigadas que eu tive oportunidade de fazer durante esses dois anos... ah, as amigadas! Os meus dias no laboratório foram um misto de nostalgia, por estar de volta ao local onde fiz o ciclo básico da minha graduação, e da mais pura diversão! O Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética (LabCHO) – também conhecido como LabShow – me acolheu de uma maneira que me fez aguardar ansiosamente pelos meus “dias de estudante”, em que o jaleco de médica ficava no cabide. Agradeço a todos aqueles que compreenderam as diferenças da minha formação inicial, que se propuseram a ajudar em vários momentos, que tiveram a paciência de me explicar os conceitos mais básicos de práticas de laboratório e técnicas de Biologia Molecular sem me julgar. Ana, técnica do laboratório, sempre disponível para uma orientação, uma conversa, uma aulinha de Zoologia casual. “Ei, você que é biólogo, me diz que bicho é esse aqui”; “Isso é uma gimnosperma, Rafa?”; “Tudo aqui dentro se chama Eppendorf?”. Tanta diversão. Aninha, Alexandre, Branca, Bruna, Carolyn, Cris, Erika, Gabriel, Gui, Helo, Igor Giner, Jessy, Lelêzão, Nina, Rafael, Rafaela, Sarah, Tamy e Tay (seja lá quem for quem): muito obrigada! Os dias de calça jeans e tênis na fila do R.U. com vocês jamais serão esquecidos. Um agradecimento extra à Aninha e Carolyn, que além da diversão tiveram que tolerar também os surtos, estresses e desabafos durante a caminhada. Que venham muitos mais cappuccinos e que vocês ainda venham me visitar no camping.

À Dra. Milena e Dr. Sérgio, do serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner, pelas revisões de lâmina, e pela paciência da Milena em discuti-las comigo.

À Thayene, minha amiga de infância, por apoiar as minhas escolhas (“MAS JÁ DEU, NÉ?”) e sempre entender as minhas ausências (ou as vezes em que eu até ia, mas levava uma apostilinha pra dar aquela estudadinha, né?). Aos pais dela, Amira e Ariel, por sempre me acolherem. Desde sempre, para sempre.

Às minhas amigas Marjorie e Bárbara, porque as ansiedades do Mestrado geram muitos áudios de WhatsApp de 9min57s.

A todos os pacientes com câncer hereditário do Hospital Erasto Gartner e do Brasil, às suas famílias, e a todos que se dedicam e lutam pela possibilidade de identificação dessas famílias e prevenção do câncer.

Ao Bacon, meu Golden Retriever, que ficou por último, mas nem liga – por me ensinar o que é alegria, amor incondicional e sem rancor.

A todos que ajudaram esse trabalho a se tornar possível, de alguma forma, meu muito obrigada!

*“There’s nowhere you can be that isn’t
where you’re meant to be... it’s easy!”*

All you need is love!”

(The Beatles)

RESUMO

A Síndrome de Lynch (SL) é uma das síndromes de predisposição hereditária ao câncer mais comuns. Ela tem herança autossômica dominante e é causada por mutação germinativa de um dos genes de reparo de malpareamento de bases, sendo os principais deles *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Os indivíduos com SL apresentam um risco aumentado para o desenvolvimento de vários tipos de tumor durante a vida, sendo os principais deles o câncer colorretal (CCR) e o de endométrio. O objetivo desse trabalho é caracterizar aspectos clínicos e moleculares das famílias com suspeita ou diagnóstico de SL desde a implantação do Serviço de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner, além de avaliar o acesso desses pacientes aos métodos diagnósticos da SL no contexto do Sistema Único de Saúde (SUS). Para isso, foram revisados retrospectivamente os prontuários de todos os pacientes atendidos no serviço entre julho de 2012 e dezembro de 2018, buscando pacientes que atendessem os critérios de inclusão propostos nesse estudo. Foram então incluídos 32 probandos, sendo 18 mulheres (56,3%) e 14 homens (43,7%), com idade média de 41,3 anos de idade ao diagnóstico do primeiro tumor. Apenas 43,3% dessas 32 famílias incluídas preenchia critérios de Amsterdam I/II. Cada um desses probandos teve de um a cinco tumores, num total de 57 tumores. Entre os 32 tumores índice, 84,4% pertenciam ao espectro da síndrome e 75% dos casos foram diagnosticados antes dos 50 anos de idade. Apenas dez desses probandos (31,2%) tiveram a oportunidade de realizar teste genético, apesar de todos os 32 terem a indicação por terem apresentado imunohistoquímica (IHQ) do tumor anormal ou história pessoal e/ou familiar sugestiva de SL. Os casos que não tiveram acesso a teste genético tiveram seu gene causal de SL inferido pelo resultado da IHQ, de modo que todos os 32 casos foram atribuídos a algum dos genes de reparo. Dos 32 casos, 13 (40,6%) foram atribuídos ao gene *MSH2*, 7 (21,9%) a *MLH1*, 7 (21,9%) a *PMS2* e 5 (15,6%) a *MSH6*. Essa distribuição difere do sugerido pela literatura, principalmente devido a um excesso de casos relacionados a *PMS2* ($p=0.004$) e escassez de *MLH1* ($p=0.005$). Entre os dez pacientes que realizaram teste genético, cinco probandos não relacionados tiveram uma mesma mutação detectada – *MSH2:c.2152C>T* (p.Gln718*). Essa mutação foi relacionada a um efeito fundador num estudo recente em Portugal, mas ainda não foi descrito efeito fundador no Brasil. Essa população de estudo nunca havia sido incluída em estudos prévios sobre a SL no Brasil. Os achados desse estudo evidenciaram algumas barreiras à adequada identificação de famílias portadoras de SL no cenário do SUS. São necessárias estratégias para melhorar o rastreamento da SL e diagnóstico de indivíduos acometidos, assim como a identificação, captação e testagem dos familiares em risco, para que esse diagnóstico possa se traduzir na prevenção de câncer em maior escala.

Palavras-chave: Síndrome de Lynch. Câncer colorretal hereditário. Mutação *MSH2:c.2152C>T*. Diagnóstico molecular no SUS.

ABSTRACT

Lynch Syndrome (LS) is among the most common hereditary cancer syndromes. It is an autosomal dominant disorder caused by a germline mutation in one of the mismatch repair genes, mainly *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* and *PMS2*. Individuals with LS are at an increased lifetime risk for several types of tumors, but mostly colorectal and endometrial cancers. This study aims to describe clinical and molecular aspects of families suspected for or diagnosed with LS since the implementation of the Oncogenetics Department at Hospital Erasto Gaertner, and also to evaluate the access of these patients to molecular diagnostic methods within the context of the Brazilian Public Health System. For this purpose, we made a retrospective chart review of all patients seen at the Oncogenetics clinics from July 2012 to December 2018, aiming to identify patients who fulfilled inclusion Criteria for this study. Thus, 32 probands were included, comprising 18 females (56,3%) and 14 males (43,7%), with a mean age of 41,3 years at their first tumor diagnosis. Only 43,3% of these 32 families fulfilled Amsterdam Criteria I/II. Each one of the probands had one to five tumors diagnosed during their lifetime, for a total of 57 tumors. Among 32 index tumors, 84,4% were included in the tumor spectrum of the syndrome, and 75% of the cases were diagnosed at 50 years old or younger. Only ten of these probands (31,2%) had access to genetic testing, even though all of them had the indication to have it done due to abnormal immunohistochemistry (IHC) results or suspect personal and/or family history. Untested cases were assigned to a causal gene based on IHC results, so that all 32 cases were assigned to one of the mismatch repair genes. Out of 32 cases, 13 (40,6%) were assigned to *MSH2*, 7 (21,9%) to *MLH1*, 7 (21,9%) to *PMS2* and 5 (15,6%) to *MSH6*. This distribution is inconsistent with data in the literature, mainly due to an excess of *PMS2* cases ($p=0.004$) and a lack of *MLH1* ($p=0.005$). Among ten patients who underwent genetic testing, five unrelated probands had the same mutation identified – *MSH2:c.2152C>T* (p.Gln718*). A founder effect has recently been described for this mutation in Portugal, but a founder effect has not yet been described in Brazil. The population of this study had not been included in previous studies regarding LS in Brazil. Our findings show there are some barriers to appropriate identification of LS families in the setting of the Brazilian Public Health System. Improvements are needed to a better screening and diagnosis of the syndrome, as well as for the identification and testing of relatives at risk. Such efforts are important to achieve cancer prevention and control in a larger scale.

Keywords: Lynch Syndrome. Hereditary colorectal cancer. *MSH2:c.2152C>T* mutation. Molecular diagnosis – public health system.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – MODELO DO SISTEMA MISMATCH REPAIR	15
FIGURA 2 – PROCESSO DE EXCLUSÃO/INCLUSÃO DOS PROBANDOS.....	43
FIGURA 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES ÍNDICE ENTRE OS PROBANDOS.	45
FIGURA 4 – PROPORÇÃO DE CASOS ATRIBUÍDOS A CADA UM DOS GENES DE REPARO.....	50
FIGURA 5 – NÍVEL DE ESCOLARIDADE DOS PROBANDOS VS. REALIZAÇÃO DE TESTE GENÉTICO.....	56
FIGURA 6 – RELAÇÃO DA PRESENÇA DE PROLE COM REALIZAÇÃO OU NÃO DE TESTE GENÉTICO.....	57

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – CRITÉRIOS DE AMSTERDAM I.....	19
QUADRO 2 – CRITÉRIOS DE AMSTERDAM II.....	20
QUADRO 3 – CRITÉRIOS REVISADOS DE BETHESDA	21
QUADRO 4 – PRINCIPAIS PARÂMETROS CLÍNICOS E MOLECULARES DOS PROBANDOS	47
QUADRO 5 – DESCRIÇÃO DOS CASOS DE EXAMES DE IMUNOISTOQUÍMICA COM RESULTADOS INICIALMENTE INCONGRUENTES	53
QUADRO 6 – DESCRIÇÃO DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO DETECTADAS	54
QUADRO 7 – ESPECTRO TUMORAL NA FAMÍLIA DOS PROBANDOS.....	58

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNDROME DE LYNCH	14
TABELA 2 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PROBANDOS	44
TABELA 3 – ESPECTRO TUMORAL NAS FAMÍLIAS COM SÍNDROME DE LYNCH ACOMPANHADAS NO HOSPITAL ERASTO GAERTNER	61

LISTA DE SIGLAS

AC I	–	Critérios de Amsterdam I (<i>Amsterdam Criteria I</i>)
AC II	–	Critérios de Amsterdam II (<i>Amsterdam Criteria II</i>)
ACMG	–	<i>American College of Medical Genetics</i>
CCR	–	Câncer colorretal
CIN	–	Instabilidade cromossômica (<i>chromosomal instability</i>)
CIMP	–	Fenótipo metilador de ilhas CpG (<i>CpG island methylator phenotype</i>)
dMMR	–	Sistema de reparo de malpareamento deficiente (<i>deficient mismatch repair</i>)
<i>EPCAM</i>	–	<i>Epithelial cell adhesion molecule</i>
HEG	–	Hospital Erasto Gaertner
HNPCC	–	Câncer Colorretal Hereditário Não-Polipose (<i>Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer</i>)
IHQ	–	Imunoistoquímica
INCA	–	Instituto Nacional do Câncer
MMR	–	Sistema de reparo de malpareamento (<i>mismatch repair system</i>)
<i>MLH1</i>	–	<i>Human mutL homolog 1'</i>
<i>MSH2</i>	–	<i>Human mutS homolog 2</i>
<i>MSH3</i>	–	<i>Human mutS homolog 3</i>
<i>MSH6</i>	–	<i>Human mutS homolog 6</i>
<i>MutLa</i>	–	<i>MLH1-PMS2</i>
<i>MutSa</i>	–	<i>MSH2-MSH6</i>
MSI	–	Instabilidade de microssatélites (<i>microsatellite instability</i>)
MSS	–	Estabilidade de microssatélites (<i>microsatellite stability</i>)
NCCN	–	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
PAF	–	Polipose Adenomatosa Familiar
PD-1	–	<i>Programmed Death-1</i>
PD-L1	–	<i>Programmed Death-Ligand 1</i>
<i>PMS2</i>	–	<i>Postmeiotic segregation increased 2</i>
SL	–	Síndrome de Lynch
SUS	–	Sistema Único de Saúde
VUS	–	Variante de significado incerto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	4
2	REVISÃO DA LITERATURA	7
2.1	O CÂNCER COLORRETAL	7
2.1.1	Definição e epidemiologia.....	7
2.1.2	Vias moleculares da carcinogênese colorretal.....	8
2.1.3	Câncer colorretal hereditário	11
2.2	A SÍNDROME DE LYNCH.....	12
2.2.1	Histórico	12
2.2.2	Estrutura dos principais genes envolvidos e função das proteínas	13
2.2.3	Características moleculares: a instabilidade de microssatélites.....	17
2.2.4	Características clínicas: o espectro tumoral clássico e novos aprendizados	18
2.2.5	Diagnóstico: dos critérios clínicos aos testes moleculares.....	19
2.2.6	Nomenclatura: a importância da padronização dos termos	25
2.2.7	A instabilidade de microssatélites como alvo terapêutico	28
2.2.8	Aconselhamento genético e manejo na síndrome de Lynch.....	32
3	OBJETIVOS	37
3.1	OBJETIVO GERAL.....	37
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
4	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1	COLETA DE DADOS	38
4.2	ANÁLISE DOS DADOS	40
5	RESULTADOS	42
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	77
	REFERÊNCIAS	79
	APÊNDICE 1 - HEREDOGRAMAS	95

1 INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é o segundo mais frequente entre mulheres e o terceiro em homens no Brasil (INCA, 2019). Os últimos dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que, para cada ano do triênio de 2020-2022, mais de 40 mil casos novos de câncer colorretal sejam diagnosticados no Brasil, sendo quase 2,5 mil deles no Paraná (INCA, 2019). Estima-se que 3-5% (ROSSI et al., 2002; DA SILVA et al., 2015) de todos os casos de CCR estejam relacionados à síndrome de Lynch (SL), que é a principal síndrome hereditária de predisposição ao câncer colorretal. A SL tem herança autossômica dominante, definida pela presença de mutação germinativa de um dos genes de reparo de malpareamento de bases (genes MMR, do inglês *mismatch repair genes*), sendo os principais deles *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2*. Esses genes codificam proteínas homônimas cuja função é reconhecer e corrigir erros na incorporação de nucleotídeos durante a replicação do DNA (GIARDIELLO et al., 2014). A falha na execução dessa função leva ao acúmulo de mutações (predominantemente pequenas inserções e deleções), principalmente em regiões de sequências altamente repetitivas no DNA, conhecidas como microssatélites. O fenótipo do tumor resultante é conhecido como alta instabilidade de microssatélites (MSI-*high* – do inglês, *microsatellite instability-high*) ou sistema de reparo deficiente (dMMR – do inglês, *deficient mismatch repair*) (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016). Em oposição, diz-se que o tecido normal apresenta estabilidade de microssatélites (MSS – do inglês, *microsatellite stability*) ou sistema de reparo proficiente (pMMR – do inglês, *proficient mismatch repair*).

Também estão inclusas no espectro da síndrome neoplasias de sítios extracolônicos, sendo o principal deles o endométrio, mas também estômago, ovário, intestino delgado, trato hepatobiliar, pelve renal, ureter, pâncreas, sistema nervoso central e neoplasias sebáceas (GIARDIELLO et al., 2014). Embora os órgãos em risco classicamente relacionados com a SL sejam os anteriormente citados, estudos recentes demonstram a ocorrência de instabilidade de microssatélites em outros tumores de fora desse espectro, incluindo tumores do córtex da adrenal, próstata, melanomas, mesoteliomas, sarcomas de partes moles, tumores de células germinativas, entre outros (RAYMOND et al., 2013; BONNEVILLE et al., 2017; ROBERTS et al., 2018; LATHAM et al., 2019). A

pesquisa da instabilidade de microssatélites passou a ter seu uso mais disseminado na prática clínica desde o advento da imunoterapia, pois a presença de instabilidade foi definida como marcador molecular preditor de resposta para esse tipo de tratamento (LE et al., 2015) – vide tópico 2.2.7. Além disso, o aumento da acessibilidade e o conseqüente uso mais amplo dos painéis multigene resulta na detecção incidental de mutações germinativas dos genes de reparo em tumores não clássicos da SL. Juntos, esses fatores acabam contribuindo para a ampliação do nosso conhecimento sobre o espectro de tumores da síndrome (YURGELUN; KASTRINOS, 2019). Isso demonstra que o contínuo estudo da síndrome de Lynch, dentro de diferentes contextos e em diferentes populações, é de fundamental importância para que possamos continuar ampliando o conhecimento e, conseqüentemente, a capacidade de melhor identificar, rastrear e tratar esses pacientes.

Na nova era da medicina de precisão, a caracterização molecular das doenças neoplásicas se mostra cada vez mais relevante, não só do ponto de vista de diagnóstico e rastreamento (no caso das doenças hereditárias), mas também do ponto de vista terapêutico (DONDORP; DE WERT, 2013). A identificação de pacientes com síndrome de Lynch e a sua inserção em programas de rastreamento para câncer colorretal comprovadamente reduz a mortalidade pela doença (JÄRVINEN et al., 2000). O diagnóstico molecular é importante pois permite a identificação de familiares saudáveis em risco, estendendo o benefício da prevenção a esse grupo (BERG et al., 2009). A descoberta da participação da via *programmed death 1* (PD-1) na supressão da resposta imune citotóxica a alguns tumores e o uso dessa via como alvo na terapia do câncer trouxeram a instabilidade de microssatélites para o foco da Oncologia (LE et al., 2015). A imunoterapia anti-PD-1 marca historicamente a primeira aprovação de terapia agnóstica pelo *Food and Drug Administration* (FDA), ou seja: a indicação da droga se baseia unicamente na presença de um marcador molecular, no caso a instabilidade de microssatélites, independente do sítio de origem ou do tipo histológico do tumor (LEMERY; KEEGAN; PAZDUR, 2017) (vide tópico 2.2.7).

Dentro desse contexto, desde 2012 o Hospital Erasto Gaertner conta com um serviço de Oncogenética, que atende casos referenciados de todo o estado do Paraná. Hoje, o serviço apresenta um fluxo importante de pacientes, incluindo famílias portadoras da síndrome de Lynch. A caracterização clínica e molecular

desses pacientes colabora com a avaliação mais precisa dos riscos de câncer colônico e extracolônico, permite o rastreamento dos familiares em risco e introduz opções terapêuticas, otimizando a prevenção do câncer e o manejo desses pacientes e de suas famílias (DA SILVA et al., 2016).

Apesar de ser uma condição já bastante estudada e bem definida, há poucos estudos dedicados a descrever os dados genotípicos e fenotípicos da síndrome em famílias brasileiras. Uma busca no banco de dados Pubmed realizada em agosto de 2019, utilizando os termos *Lynch Syndrome AND Brazil*, *Lynch Syndrome AND brazilian*, *HNPCC AND Brazil* e *HNPCC AND brazilian*, filtrando para artigos contendo esses termos no título e/ou no *abstract*, retornou ao todo 16 resultados distintos. A população de pacientes do serviço de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner não está incluída em nenhum desses estudos prévios. É importante lembrar que a colonização da região sul do país difere das demais regiões devido à forte participação também dos europeus não latinos, como os alemães e, em especial no estado do Paraná, poloneses e ucranianos. O compartilhamento dos dados dessa população pode contribuir para a identificação de particularidades genotípicas e/ou fenotípicas relacionadas a esse contexto de ancestralidade distinta. O objetivo inicial desse trabalho foi caracterizar aspectos clínicos e moleculares das famílias com suspeita ou diagnóstico de Lynch desde a implantação do Serviço de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner. Entretanto, por se tratar de um serviço cujo atendimento é hoje 100% realizado através do Sistema Único de Saúde (SUS), encontramos dificuldades na realização desse trabalho que remetem às limitações inerentes ao manejo de doenças de alta complexidade dentro do sistema público de saúde. Entre elas, estão questões referentes não só à dificuldade de realizar testes essenciais ao diagnóstico, mas também de realização do correto rastreamento, manejo e de teste em cascata. Apontar e discutir os desafios na implantação do aconselhamento, seguimento e dos testes genéticos no contexto do sistema de saúde público brasileiro tornaram-se também um objetivo deste trabalho.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O CÂNCER COLORRETAL

2.1.1 Definição e epidemiologia

A exemplo de todos os tecidos do corpo, o epitélio colorretal depende de um complexo sistema regulatório para manter sua homeostasia e integridade durante a divisão celular e replicação. Alterações nesses mecanismos podem levar à transformação maligna (STEELE et al., 2016). O câncer colorretal (CCR) resulta de um processo de várias etapas, que envolve o acúmulo de eventos genéticos e epigenéticos ao longo do tempo, levando finalmente à vantagem proliferativa, expansão clonal e aparecimento de um tumor com capacidade de invasão (VOGELSTEIN; KINZLER, 2015). Com o conhecimento atual sobre as alterações moleculares que levam ao CCR, sabemos que não se trata de uma entidade única, mas sim de uma doença heterogênea, uma vez que diferentes vias de carcinogênese levam à formação de tumores com fenótipo, prognóstico e resposta à terapia distintos (DIENSTMANN; SALAZAR; TABERNERO, 2014).

O tipo histológico mais comum entre as neoplasias malignas colorretais é o adenocarcinoma. Não há diferença relatada na distribuição da doença entre os sexos no Brasil (INCA, 2019); nos Estados Unidos, a incidência é 40% mais alta em homens do que em mulheres. O envelhecimento é um fator de risco para o CCR e cerca de 90% dos casos são diagnosticados após os 50 anos (STEELE et al., 2016).

Em tese, todo CCR surge de uma lesão pré-maligna, potencialmente identificável e removível por colonoscopia (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; WINAWER et al., 1993; MUNDADE et al., 2014). O tempo entre o início da carcinogênese e o surgimento de uma lesão maligna costuma ser longo, oferecendo oportunidade para intervenção nesse período (RUTTER et al., 2015). Apesar do grande potencial de prevenção desses tumores através da realização de um exame altamente eficaz, que é a colonoscopia (WINAWER et al., 1993), os tumores colorretais continuam a figurar entre os mais frequentes ao redor do mundo. Nos Estados Unidos, o CCR é o terceiro câncer mais comumente diagnosticado entre homens e mulheres, e a segunda principal causa de mortalidade por câncer (STEELE et al., 2016). No Brasil, o câncer colorretal é o segundo mais frequente,

tanto para o sexo feminino quanto para o sexo masculino (INCA, 2019). Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) estimam que, no ano de 2020, cerca de 2,5 mil casos novos de câncer colorretal serão diagnosticados no Paraná, sendo cerca de 400 apenas em Curitiba (INCA, 2019). Devido à sua alta incidência, o CCR é uma importante questão de saúde pública.

2.1.2 Vias moleculares da carcinogênese colorretal

Classicamente, coloca-se que o CCR pode se originar de três vias carcinogênicas distintas, sendo elas: 1) instabilidade cromossômica (CIN – do inglês, *chromosomal instability*); 2) instabilidade de microssatélites e; 3) fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP – do inglês, *CpG island methylator phenotype*). É importante notar que: apesar de distintos, os fenótipos relacionados a cada uma das vias se sobrepõem; nenhuma das vias é exclusiva da forma esporádica ou da hereditária do CCR – as três vias estão representadas em ambas as formas (STEELE et al., 2016).

A via da instabilidade cromossômica é também conhecida como a via clássica adenoma-adenocarcinoma da carcinogênese colorretal, e seria responsável pelo desenvolvimento de 70-85% dos casos de CCR. Esse modelo sugere a progressão neoplásica por uma sequência de acúmulo de mutações *drivers* em oncogenes e genes supressores de tumor (FEARON; VOGELSTEIN, 1990; VOGELSTEIN; KINZLER, 2015). Segundo esse modelo, o CCR se inicia por mutações nos genes da via *adenomatous polyposis coli*, que incluem não apenas o gene *APC*, mas também *CTNNB1*, *SOX9*, *TCF7L1*, *TCF7L2* e *AMER1* (VOGELSTEIN; KINZLER, 2015). O gene *APC* é um supressor de tumor cujo produto proteico atua na via de sinalização *Wnt*. Nessa via, a proteína APC forma um complexo multiproteico com a glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3 β) e a β -catenina. Ao fosforilar a β -catenina, GSK-3 β garante que ela seja alvo de ubiquitinação e consequente degradação. Logo, na perda de função do gene *APC*, a β -catenina é poupada dessa destruição e se acumula, dirigindo-se então ao núcleo celular, onde atua ativando genes relacionados à proliferação celular (BREMBECK; ROSÁRIO; BIRCHMEIER, 2006).

Outro evento importante na via CIN é a ativação do oncogene *KRAS*. As proteínas da família RAS têm um papel importante na divisão celular, diferenciação e mitose (MUNDADE et al., 2014). Uma das vias mais conhecidas reguladas pela

família RAS é a via de sinalização RAS → Raf → MEK → Erk. Essa cascata de fosforilação resulta na ativação das cinases reguladas por sinal extracelular (Erk1 e Erk2; do inglês – *extracellular signal-regulated kinase 1 e 2*), que então fosforilam substratos que regulam vários processos celulares. Erk1/2 fosforilam não apenas substratos citoplasmáticos, que regulam a tradução, mas também se translocam para o núcleo, onde fosforilam fatores de transcrição (WEINBERG, 2014). A proteína RAS atua como uma proteína G – no seu estado inativo, liga-se à guanina difosfato (GDP). Sinais mitogênicos ativam o fator trocador de nucleotídeos de guanina (GEF), induzindo a proteína RAS inativa a trocar seu GDP por guanosina trifosfato (GTP). A ligação à GTP modifica a configuração da proteína para uma forma ativa, emissora de sinal, que perdura até que ocorra a clivagem de GTP através da função intrínseca de GTPase da proteína RAS. As mutações oncogênicas de *KRAS* levam à perda da sua atividade GTPase, levando à manutenção da conformação ativa e ativação constitutiva das vias pró-proliferativas à jusante. Finalmente, a perda de outros genes supressores de tumor, como *TP53*, *SMAD4* e *PIK3CA* contribui para o fenótipo de instabilidade cromossômica e desenvolvimento do câncer colorretal (MUNDADE et al., 2014).

Uma segunda via que seria responsável por cerca de 15% dos casos de CCR seria a instabilidade de microssatélites. A MSI é definida como uma alta frequência de alterações no comprimento de regiões de DNA altamente repetitivo (microssatélites), o que é resultado da perda de atividade do sistema de reparo de malpareamento do DNA (dMMR) (KOCARNIK; SHIOVITZ; PHIPPS, 2015). Na maioria dos casos, essa instabilidade é decorrente do silenciamento epigenético do gene *MLH1*, que é um dos genes do sistema de malpareamento. Esse silenciamento se dá através da hipermetilação de ilhas CpG da região promotora do gene (BOLAND; GOEL, 2010). Porém, numa parcela dos pacientes, a MSI resulta de mutação germinativa em um dos genes desse sistema de reparo, caracterizando a síndrome de Lynch. Independentemente da causa, defeitos no sistema de reparo de malpareamento levam ao acúmulo de mutações e, portanto, aumento de suscetibilidade à formação de tumores (MUNDADE et al., 2014; KOCARNIK; SHIOVITZ; PHIPPS, 2015). Por se tratar da principal via de carcinogênese envolvida na formação dos tumores da síndrome de interesse, os mecanismos moleculares da instabilidade de microssatélites serão abordados de forma mais detalhada nos tópicos 2.2.2 e 2.2.3.

Conforme citado acima, padrões aberrantes de metilação de ilhas CpG têm sido amplamente observados em CCR e estão associados ao silenciamento gênico quando ocorrem em regiões promotoras (WEISENBERGER et al., 2006). A combinação de um nucleotídeo citosina seguido por um nucleotídeo guanina (dinucleotídeo CpG) é incomum no genoma humano. Porém, regiões de densa aglomeração desse dinucleotídeo, denominadas ilhas CpG, são vistas na região promotora de aproximadamente metade de todos os genes. Padrões aberrantes de hipermetilação dessas ilhas têm sido associados com silenciamento de genes supressores de tumor, colaborando para o surgimento de câncer (LEGGETT; WHITEHALL, 2010). Uma parcela dos tumores colorretais apresentam frequência excepcionalmente alta de metilação de algumas ilhas CpG, levando à sugestão da existência de um fenótipo distinto denominado fenótipo metilador de ilhas CpG ou *CIMP-high*. A ocorrência esporádica de dMMR ocorre quase exclusivamente como consequência de metilação da região promotora de *MLH1* associada com *CIMP-high* e, nesses casos, há uma forte correlação com a presença de mutação do gene *BRAF* (WEISENBERGER et al., 2006). As lesões precursoras dos tumores originados dessa via são os adenomas sésseis serrilhados e os adenomas serrilhados tradicionais e, por isso, ela também é conhecida como via serrilhada. Sugere-se que o surgimento de cada um desses precursores está relacionada à hipermetilação de promotores de genes distintos; à ocorrência mutuamente exclusiva de mutação no gene *BRAF* ou no *KRAS*; e resulta na formação de tumores que podem ser *MSI-high* ou *MSS*, respectivamente, inclusive com prognósticos distintos (LEGGETT; WHITEHALL, 2010; KIM et al., 2016b)

É importante compreender que, apesar das diferentes denominações, os fenótipos de todas essas vias se intersectam, e nenhuma alteração é exclusividade de nenhuma delas. Além da sobreposição entre as vias citadas, a heterogeneidade do CCR se dá também por interação com outras vias menos descritas ou ainda não descritas (MUNDADE et al., 2014). Além disso, o crescente conhecimento da biologia molecular do câncer em diferentes níveis (na epigenética, na transcriptômica, na proteômica, na imunologia, entre outros) deixou claro que a complexidade do microambiente tumoral vai muito além da genômica. Dentro desse contexto, surgiu em 2014 um consórcio internacional (*The Colorectal Cancer Subtyping Consortium*) dedicado ao compartilhamento de dados em larga escala entre grupos de especialistas. Em 2015, esse grupo publicou um consenso sobre a

classificação molecular (CMS – do inglês, *consensus molecular subtypes*) para o câncer colorretal (GUINNEY et al., 2015). Atualmente, a comunidade científica trabalha para traduzir esse conhecimento para aplicação na prática clínica (WANG et al., 2019).

2.1.3 Câncer colorretal hereditário

O CCR ocorre nas formas esporádica, familiar e hereditária. Estima-se que até 30% dos casos tem um componente familiar, mas apenas cerca de 1/3 deles (ou seja, 10% do total) tem de fato um mecanismo de herança conhecido (formas hereditárias) (LYNCH et al., 2004; KALADY; HEALD, 2015). Nos últimos anos, o desenvolvimento das técnicas de sequenciamento de próxima geração possibilitou a identificação de novos genes causais para o CCR hereditário (VALLE, 2017). Hoje, o diagnóstico molecular dos casos hereditários não tem impacto apenas no estabelecimento de esquemas de rastreamento e prevenção; ele tem também, muitas vezes, consequência direta na estratégia de tratamento desses pacientes, inclusive através de drogas desenhadas especificamente para agir sobre os mecanismos moleculares envolvidos com essas síndromes (VALLE et al., 2019).

De forma simplificada, as síndromes de predisposição ao CCR são divididas entre as que cursam com polipose e as que não cursam com polipose. As poliposes são então subdivididas de acordo com a histologia dos pólipos: adenomas, hamartomas ou serrilhados. As síndromes de polipose adenomatosa são a polipose adenomatosa familiar (PAF) e a polipose associada ao gene *MUTYH*. As poliposes hamartomatosas são bem mais raras e incluem a síndrome de Peutz-Jeghers (causada por mutações germinativas no gene *STK11*), a síndrome da polipose juvenil (genes *BMPR1A* e *SMAD4*) e a síndrome de Cowden (gene *PTEN*). Os pólipos serrilhados, quando encontrados em uma determinada quantidade e um determinado tamanho, definem clinicamente uma entidade descrita mais recentemente, que é a síndrome da polipose serrilhada (SNOVER et al., 2010; KALADY; HEALD, 2015). O gene responsável pela síndrome da polipose serrilhada ainda não foi definido, porém estudos recentes de sequenciamento de exoma em indivíduos preenchendo critérios clínicos para a síndrome demonstraram mutações germinativas no gene *RNF43* (GALA et al., 2014). Todas as poliposes citadas acima

tem padrão de herança autossômico dominante, exceto pela polipose associada ao gene *MUTYH*, que é de herança autossômica recessiva.

As síndromes que não cursam com polipose são genericamente chamadas de HNPCC – do inglês, *hereditary nonpolyposis colorectal cancer* – e a principal síndrome representante desse grupo é a síndrome de Lynch. O termo HNPCC é inclusive muitas vezes usado de forma sinônima para se referir à síndrome de Lynch; porém, a comunidade científica internacional em câncer colorretal hereditário propõe que esses termos não sejam usados intercambiavelmente (KRAVOCHUCK et al., 2014). A questão da nomenclatura será discutida de forma mais aprofundada no tópico 2.2.5.

A síndrome de Lynch é não só a principal síndrome de predisposição ao CCR, respondendo por 2-7% de todos os casos (LYNCH et al., 2004), mas também uma das principais síndromes de predisposição hereditária a câncer, com uma incidência estimada de 1 a cada 280 indivíduos na população (WIN et al., 2017). Apesar da alta frequência, a SL é atualmente subreconhecida, subdiagnosticada e submanejada e, conseqüentemente, a oportunidade de reduzir a mortalidade desses indivíduos por tumores preveníveis é frequentemente perdida (SINGH et al., 2010; MONAHAN et al., 2017).

2.2 A SÍNDROME DE LYNCH

2.2.1 Histórico

A síndrome de Lynch é uma condição de herança autossômica dominante que predispõe seus portadores ao desenvolvimento de alguns tipos de câncer em idade jovem (WARTHIN, 1913; LYNCH; KRUSH, 1971). A síndrome não foi originalmente descrita pelo Dr. Henry Thompson Lynch, que deu nome à síndrome, mas sim por um patologista da Universidade de Michigan, em Ann Arbor, Dr. Aldred Scott Warthin. Em 1895, uma senhora que trabalhava como costureira para a sua família comentou com tristeza a sua provável futura morte por câncer, assim como acontecera com todos os membros de sua família. De fato, ela sucumbiu a um câncer de endométrio alguns anos mais tarde, como previu. Dr. Warthin então revisou os casos e desenhou o heredograma dessa família, que chamou de “família G”, pelo fato de terem emigrado da Alemanha (*Germany*) antes da Guerra Civil.

Após notar que os descendentes daqueles que tinham câncer muitas vezes também desenvolviam tumores, enquanto a prole dos não acometidos por câncer também era saudável, Dr. Warthin concluiu que parecia haver algum tipo de predisposição familiar a câncer (WARTHIN, 1913). Ele publicou também um estudo mais aprofundado dessa família, em 1925, quando ele já tinha reconhecido uma suscetibilidade especialmente aumentada para tumores do trato gastrointestinal e do útero, em idade jovem (BOLAND; LYNCH, 2013).

Warthin morreu em 1931 e os seus achados se mantiveram dormentes até os anos 60. Nesse intervalo, houve apenas relatos ocasionais de aglomeração familiar de câncer colorretal, até que em 1966 o Dr. Henry Lynch reportou o caso de várias famílias em detalhes. Dr. Lynch conhecia as publicações do Dr. Warthin sobre a família G, e foi até Ann Arbor para conhecê-los pessoalmente, conseguindo dados referentes a mais de 650 membros da família. Ele então reconheceu o padrão autossômico dominante de herança, mas não definiu o substrato da hereditariedade (LYNCH; KRUSH, 1971). A instabilidade de microssatélites, que é o achado molecular característico dos tumores da síndrome, só foi descrita em 1993 (IONOV et al., 1993), e alguns meses depois surgiu o primeiro relato de mutação num gene com conhecida associação à MSI em bactérias sendo encontrada num paciente com câncer colorretal (FISHEL et al., 1993).

Hoje, mais de 100 anos depois da descrição do Dr. Warthin, sabemos que a síndrome é determinada pela presença de mutação germinativa nos genes que codificam proteínas responsáveis pelo reparo de danos ao DNA, chamados de genes de reparo ou *mismatch repair*. Os principais genes envolvidos são: human MutL Homolog 1 (*hMLH1*), human MutS Homolog 2 (*hMSH2*), human MutS Homolog 6 (*hMSH6*) e human Postmeiotic Segregation increased 2 (*hPMS2*) (LYNCH, 2017). Vários estudos demonstram que *MLH1* e *MSH2* são os genes responsáveis pela maioria dos casos da síndrome, respondendo sozinhos por 80-90% das variantes patogênicas identificadas (VALENTIN et al., 2011; GIARDIELLO et al., 2014).

2.2.2 Estrutura dos principais genes envolvidos e função das proteínas

Os principais genes envolvidos com a SL são os genes *MLH1* (OMIM *120436), *MSH2* (OMIM *609309), *MSH6* (OMIM *600678), *PMS2* (OMIM *600259) e *EPCAM* (OMIM *185535). O *locus*, o tamanho e o número de éxons de cada um

desses genes, além do número de aminoácidos da proteína codificada, estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 – ESTRUTURA DOS PRINCIPAIS GENES ENVOLVIDOS NA SÍNDROME DE LYNCH

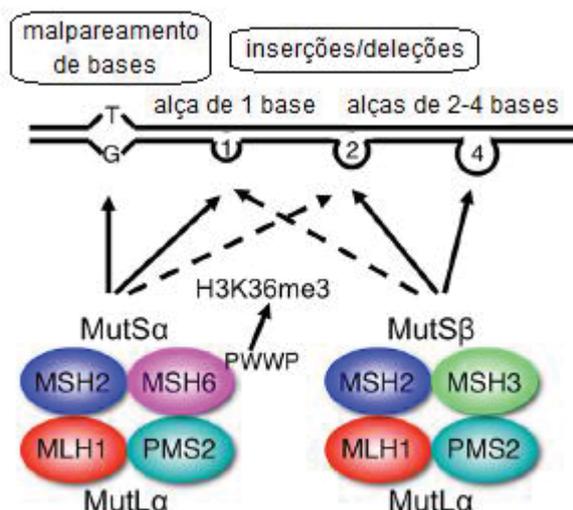
	<i>Locus</i>	Tamanho (kb)	Éxons	Nº de aminoácidos
<i>MLH1</i>	3p22.2	57	19	756
<i>MSH2</i>	2p21-p16	73	16	934
<i>MSH6</i>	2p16.3	114	10	1360
<i>PMS2</i>	7p22.1	16	15	862
<i>EPCAM</i>	2p21	42	9	314

FONTE: (GENECARDS; OMIM, 2020)

LEGENDA: Kb: quilobases.

Esses genes (exceto por *EPCAM*) produzem proteínas homônimas que participam de um dos sistemas de reparo do DNA: o reparo de malpareamento de bases (ou *mismatch repair*). No seu estado funcional, as proteínas MMR estão organizadas em heterodímeros: *MLH1* se dimeriza com *PMS2*, formando o complexo MutL α ; e *MSH2* com *MSH6*, formando o complexo MutS α . A detecção dos erros é realizada pelo complexo MutS α (ou, em menor proporção, pelo MutS β , formado por *MSH2/MSH3*), que então recruta MutL α , que degrada a extensão mutada e reinicia a síntese. (Figura 1 - YAMAMOTO; IMAI, 2015).

As consequências da perda desse importante mecanismo de reparo do DNA serão discutidas no tópico 2.2.3.

Figura 1 – MODELO DO SISTEMA *MISMATCH REPAIR*

FONTE: Adaptada de YAMAMOTO; IMAI, 2015.

LEGENDA: A imagem ilustra o mecanismo proposto de heterodimerização das proteínas do sistema MMR. Em células eucarióticas, erros de pareamento entre bases e pequenas inserções/deleções são corrigidos por esse sistema. Em humanos, o sistema MMR conta com a atividade de quatro proteínas principais: MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. A detecção dos erros é realizada pelo complexo MutSα (ou, em menor proporção, pelo MutSβ, formado pelas proteínas MSH2/MSH3), que então recruta MutLα. MutLα degrada a extensão mutada e reinicia a síntese. Num recente estudo *in vivo*, a trimetilação da histona H3 na Lys36 (H3K36 me3) foi identificada como um marcador epigenético necessário para o recrutamento de MutSα para a cromatina através de interação com o domínio PWWP de MSH6.

Além dos quatro genes citados, deleções envolvendo a região 3' do gene *EPCAM* (ou *TACSTD1*) também podem causar a SL (LIGTENBERG et al., 2009; GUARINOS et al., 2010). Esse gene se localiza cerca de 16 quilobases à montante de *MSH2* e, portanto, deleções que eliminam seu códon de terminação resultam na continuidade da transcrição através da região promotora de *MSH2*, levando à sua hipermetilação e conseqüente silenciamento epigenético deste gene (RUMILLA et al., 2011; GIARDIELLO et al., 2014).

Ainda em relação à estrutura dos genes de reparo, algumas particularidades referentes ao gene *PMS2* têm impacto clínico e merecem atenção. O gene *PMS2* possui múltiplos pseudogenes já identificados no genoma humano (NICOLAIDES et al., 1995; DE VOS et al., 2004). Pseudogenes são regiões genômicas não funcionais cujas sequências são altamente similares às de um gene funcional (PODLAHA; ZHANG, 2010). Na maioria dos casos, os pseudogenes se originam de duplicação do gene ancestral, gerando um gene homólogo funcionalmente redundante que gradualmente vai acumulando mutações e então perde sua função (PODLAHA;

ZHANG, 2010). Entre os pseudogenes de *PMS2*, o mais crítico é o *PMS2CL*, que exibe extrema similaridade aos éxons 9 e 11-15 do gene *PMS2* (VAUGHN et al., 2011). Além disso, a ampla ocorrência de conversão gênica entre essas regiões torna impossível que as poucas bases não idênticas sejam confiavelmente atribuídas ao gene ou ao pseudogene (HAYWARD et al., 2007). Devido a esses fatores, a detecção de mutações no gene *PMS2* representa um desafio laboratorial, visto a dificuldade de se encontrar regiões exclusivas ao gene para ancoragem de *primers* e a dificuldade de desambiguação das variantes detectadas. Estratégias baseadas em análise de RNA (ou dos transcritos do gene *PMS2* funcional), através do sequenciamento de cDNA obtido como produto de amplificação de PCR via transcriptase reversa, também já demonstraram vantagem em relação ao sequenciamento de DNA genômico (ETZLER et al., 2008). Em outra alternativa, Vaughn et. al descreveram uma técnica de *long-range* PCR com ancoramento do *primer forward* no éxon 10, que não é compartilhado pelo pseudogene, para obtenção de amplificação preferencial de *PMS2* (VAUGHN et al., 2010). Logo, é importante lembrar que variantes patogênicas detectadas nos últimos cinco éxons de *PMS2* devem passar por desambiguação para definição da sua origem, e técnicas para o aprimoramento desse processo vem sendo descritas na literatura (GOULD et al., 2018).

É importante ressaltar que os genes aqui listados são aqueles já conhecidos e sabidamente relacionados com a SL até o momento, mas podem não ser os únicos. Além dos quatro principais genes mencionados, existem outros genes que respondem por uma diminuta fração dos casos de SL. Mutações germinativas dos genes *MLH3* e *MSH3*, por exemplo, parecem ser responsáveis pela síndrome numa minoria dos casos, geralmente com fenótipo mais brando e menos característico (WU et al., 2001; DURATURO et al., 2011). Estudos recentes em pacientes suspeitos para SL, mas sem mutação germinativa detectada nos genes citados, mostram que mutações em outros genes envolvidos no processo de reparo de malpareamento podem ser a causa da síndrome em pacientes sem diagnóstico molecular até então (XAVIER et al., 2019). Com o uso crescente dos painéis multigene e do sequenciamento genômico global, principalmente em pacientes e famílias com fenótipos menos específicos, a tendência é de que ocorra a descoberta progressiva de mutações em genes causadores menos comuns, assim como de

alelos de baixa penetrância, levando à ocorrência da doença por interação poligênica (MARTINEZ; KOLODNER, 2010; DURATURO et al., 2011).

2.2.3 Características moleculares: a instabilidade de microssatélites

Do ponto de vista molecular, a mutação germinativa nos genes MMR se traduz no que chamamos de instabilidade de microssatélites ou sistema de reparo deficiente. Microssatélites são sequências simples de um a seis nucleotídeos repetidos no DNA que, devido à sua estrutura repetitiva, estão mais sujeitos a erros durante a replicação (GELSOMINO et al., 2016). Esses defeitos são normalmente identificados e corrigidos pelo sistema MMR. A deficiência das proteínas de reparo em corrigir esses erros na incorporação de nucleotídeos durante a replicação leva ao seu acúmulo, o que se traduz em instabilidade genética (LYNCH et al., 2008; GIARDIELLO et al., 2014). Essa instabilidade tem potencial oncogênico quando ocorre em regiões codificadoras de genes envolvidos em funções celulares e vias de sinalização cruciais no controle do ciclo celular (GELSOMINO et al., 2016).

Ressalta-se que a MSI não é exclusiva da SL: 90% dos tumores colorretais relacionados à síndrome apresentam MSI (GIARDIELLO et al., 2014), mas ela também está presente em 10-15% dos tumores esporádicos (GIARDIELLO et al., 2014; YAMAMOTO; IMAI, 2015; GELSOMINO et al., 2016). Logo, os casos esporádicos com instabilidade de microssatélites são mais comuns do que os de origem hereditária (BOLAND; GOEL, 2010; KOCARNIK; SHIOVITZ; PHIPPS, 2015). Nos casos esporádicos, o mecanismo causador da instabilidade é, na maioria das vezes, inativação epigenética do gene *MLH1* por hipermetilação da região promotora (BOLAND; GOEL, 2010; GELSOMINO et al., 2016).

Uma característica notável dos tumores com dMMR é que, devido à própria função desse sistema de reparo, eles tendem a se acumular uma grande quantidade de mutações do tipo *frameshift* em genes codificantes contendo regiões de DNA microssatélite. A mudança do quadro de leitura resulta na tradução de proteínas bastante distintas em relação ao esperado, que funcionam como neoantígenos, determinando alta imunogenicidade a esses tumores (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016). Essa característica tumoral é hoje importante alvo de estudo no campo do tratamento dos tumores MSI-*high*, relacionados ou não à SL (vide tópico 2.2.7).

2.2.4 Características clínicas: o espectro tumoral clássico e novos aprendizados

Clinicamente, a SL se caracteriza por um aumento no risco para o desenvolvimento de tumores colorretais e extracolônicos durante a vida, com diagnóstico em idade mais jovem que o esperado. O risco de CCR associado à SL varia na literatura entre 30-80% (GIARDIELLO et al., 2014; SEHGAL et al., 2014; DA SILVA et al., 2016), com idade média de 45 anos ao diagnóstico (SEHGAL et al., 2014; MACARON; LEACH; BURKE, 2015). Outras neoplasias com incidência aumentada são o câncer de endométrio (14-71%, idade 48-62 anos), estômago (0,2-13%, idade 49-55 anos), ovário (4-20%, idade 43-45 anos), trato urinário (0,2-25%, idade 52-60 anos) e, em menores proporções, tumores do intestino delgado, trato hepatobiliar, pâncreas, sistema nervoso central e neoplasias sebáceas (GIARDIELLO et al., 2014). Os riscos para cada órgão, assim como a idade ao diagnóstico, se correlacionam com o gene envolvido. O melhor exemplo dessa variação é o fenótipo da SL em pacientes com mutação de *PMS2*. Vários estudos demonstram uma penetrância bastante reduzida do câncer colorretal nesses pacientes (10-15%) (MØLLER et al., 2017; TEN BROEKE et al., 2018), assim como idade mais avançada ao diagnóstico (GIARDIELLO et al., 2014; MØLLER et al., 2017; TEN BROEKE et al., 2018). Sabe-se também que o CCR relacionado à SL tem, muitas vezes, algumas características fenotípicas e histológicas típicas, como localização mais frequentemente proximal, tumores pouco diferenciados, componente mucinoso, presença de células em anel de sinete, infiltração linfocitária intra e peritumoral e padrão de crescimento medular (JENKINS et al., 2007). Os pacientes com SL também apresentam maior chance de apresentarem tumores sincrônicos ou metacrônicos, em comparação com a população geral (LYNCH; DE LA CHAPELLE, 2003).

Além dos tumores classicamente incluídos no espectro da síndrome, tem sido observada e descrita a ocorrência de outros tumores em frequência aumentada nos portadores da síndrome em relação à população geral. Um estudo envolvendo pacientes com tumores de córtex da adrenal, um sítio classicamente associado com a síndrome de Li-Fraumeni, revelou que 3 de 94 (3,2%) pacientes que passaram por aconselhamento e teste genético eram portadores da SL. Essa porcentagem é comparável à proporção de pacientes com câncer colorretal e de endométrio que

são portadores da síndrome, revelando os carcinomas do córtex da adrenal como mais um novo sítio associado ao espectro da SL. De forma interessante, esses três tumores se apresentaram como MSS à pesquisa molecular (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016). A possibilidade de o câncer de mama pertencer ao espectro da SL vem sendo levantada e debatida há alguns anos. Um estudo recente revelou que mulheres com famílias apresentando critérios clínicos para investigação de síndrome de câncer de mama e ovário hereditários (HBOC – do inglês, *hereditary breast and ovarian cancer*), quando submetidas a painel multigene, apresentaram mutações nos genes *MSH6* e *PMS2* (ROBERTS et al., 2018). De maneira semelhante aos tumores de mama, a associação entre câncer de próstata e síndrome de Lynch vem sendo sugerida na literatura de forma crescente (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2016). A maior acessibilidade e conseqüente uso mais disseminado dos painéis multigene tem revelado achados como esses, trazendo clareza sobre a limitação dos nossos conhecimentos sobre os fenótipos de síndromes tão comuns quanto HBOC e SL. Além da ampliação do uso dos painéis multigene, a aprovação do pembrolizumabe como terapia agnóstica para tumores apresentando instabilidade de microssatélites vem levando ao uso mais amplo da pesquisa de MSI em tumores de vários sítios (LATHAM et al., 2019). Isso vem impulsionando, como conseqüência, a ampliação dos nossos conhecimentos sobre os tumores relacionados à síndrome.

2.2.5 Diagnóstico: dos critérios clínicos aos testes moleculares

Em 1990, o *International Collaborative Group on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer* estabeleceu critérios clínicos diagnósticos para a síndrome, conhecidos como critérios de Amsterdam I (VASEN et al., 1991) (Quadro 1).

Quadro 1 – CRITÉRIOS DE AMSTERDAM I

1. Ao menos três familiares com diagnóstico de câncer colorretal confirmado histologicamente, sendo um deles parente de primeiro grau dos outros dois.
2. Ao menos duas gerações sucessivas afetadas.
3. Um dos afetados deve ter recebido o diagnóstico antes dos 50 anos.
4. Descartada polipose adenomatosa familiar.

FONTE: Adaptado de VASEN (1991).

Por serem considerados muito rigorosos para aplicação clínica e em pesquisa, critérios mais abrangentes (Amsterdam II) foram estabelecidos em 1999 (VASEN et al., 1999) (Quadro 2).

Quadro 2 – CRITÉRIOS DE AMSTERDAM II

1. Ao menos três familiares com diagnóstico de câncer associado a HNPCC* confirmado histologicamente, sendo um deles parente de primeiro grau dos outros dois.
2. Ao menos duas gerações sucessivas afetadas.
3. Um dos afetados deve ter recebido o diagnóstico antes dos 50 anos.
4. Descartada polipose adenomatosa familiar.

FONTE: Adaptado de VASEN (1999).

LEGENDA: * câncer colorretal, endométrio, pelve renal, ureter ou intestino delgado.

Pacientes preenchendo esses critérios são classificados sob a denominação de “câncer colorretal hereditário não-polipose” (HNPCC). Embora os termos HNPCC e SL sejam comumente usados como sinônimos, em rigor é necessário confirmar a presença da mutação germinativa por teste genético para determinação da síndrome de Lynch, ou ao menos a demonstração da instabilidade de microssatélites, que é o marco molecular da síndrome (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017).

Além dos critérios de Amsterdam, os critérios revisados de Bethesda (UMAR et al., 2004) (Quadro 3) são um terceiro conjunto de dados clínico-patológicos desenvolvidos para identificar, com mais sensibilidade, indivíduos que merecem investigação para SL através de avaliação de instabilidade de microssatélites ou imunohistoquímica (IHQ) das proteínas de reparo no tumor. Apesar dos esforços para a criação de critérios clínicos progressivamente mais abrangentes, está demonstrado que limitar a investigação da SL apenas aos pacientes que preenchem esses critérios clínicos resulta na não-identificação de cerca de um a cada quatro casos de SL (HAMPEL et al., 2008). Isso justifica a importância de se descrever e compartilhar na literatura os aspectos clínicos de diferentes populações, visando melhor conhecer e compreender o espectro de tumores da síndrome, a variabilidade na penetrância dos diferentes genes para diferentes tumores, as características dos tumores de diferentes sítios na avaliação imunohistoquímica e na pesquisa de instabilidade de microssatélites, entre outros.

Quadro 3 – CRITÉRIOS REVISADOS DE BETHESDA

1. Diagnóstico de câncer colorretal antes dos 50 anos.
2. Câncer colorretal ou outro tumor associado a HNPCC† sincrônico ou metacrônico, independentemente da idade.
3. Câncer colorretal com histologia sugestiva* de instabilidade de microssatélites diagnosticado antes dos 60 anos.
4. Câncer colorretal e um ou mais parentes de primeiro grau com câncer colorretal ou associado a HNPCC†, com um dos casos diagnosticado antes dos 50 anos.
5. Câncer colorretal e dois ou mais parentes de primeiro ou segundo grau com câncer colorretal ou associado a HNPCC† diagnosticado em qualquer idade.

FONTE: Adaptado de UMAR (2004).

LEGENDA: † endométrio, estômago, ovário, pâncreas, ureter, pelve renal, vias biliares, intestino delgado, glioblastoma, adenoma de glândulas sebáceas ou ceratoacantoma. * presença de infiltrado linfocitário intratumoral, reação linfocitária *Crohn's-like*, diferenciação mucinosa ou com células em anel de sinete, padrão de crescimento medular.

É importante ressaltar que, desde 2016, a indicação formal da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) é que todo tumor colorretal diagnosticado seja submetido a rastreamento para SL através de imunoistoquímica para proteínas de reparo e/ou pesquisa molecular de instabilidade de microssatélites (NCCN, 2019a), independentemente de quaisquer dos critérios clínicos citados. Essa estratégia, denominada rastreamento universal, visa aumentar a sensibilidade na identificação de pacientes com SL, já que a doença é sabidamente subdiagnosticada (MONAHAN et al., 2017). Do ponto de vista econômico, essa abordagem já demonstrou ser custo-efetiva (MVUNDURA et al., 2010; LADABAUM et al., 2011), porém as dificuldades relacionadas à implantação da logística necessária ainda são um fator limitante para a sua disseminação (MARQUEZ et al., 2013).

Na prática clínica, a pesquisa de MSI pode ser realizada por análise de DNA (molecular) ou por imunoistoquímica (GIARDIELLO et al., 2014; NCCN, 2019a). Para a pesquisa molecular, o método mais difundido na prática clínica é a pesquisa por reação em cadeia da polimerase (PCR, do inglês, *polymerase chain reaction*) utilizando-se o painel de Bethesda (BOLAND et al., 1998). Esse painel inclui cinco marcadores microssatélites (os mononucleotídeos BAT25 e BAT26 e os dinucleotídeos D5S346, D2S123 e D17S250), que são então amplificados por PCR. O tamanho dos produtos amplificados pode então ser avaliado com o uso de eletroforese capilar. Amostras sem alterações detectáveis no comprimento das regiões microssatélites (quando comparadas ao tecido normal) são consideradas estáveis (MSS). Amostras apresentando alterações em dois ou mais desses marcadores são classificadas como MSI-*high*, enquanto aquelas apresentando alterações em apenas um desses marcadores são definidas como MSI-*low* (baixa

instabilidade de microssatélites) (ZHANG, 2008). A relevância biológica do fenótipo MSI-*low* não é bem estabelecida e, por não haver diferenças clínicas apreciáveis entre os tumores MSS e MSI-*low*, esses dois fenótipos são geralmente agrupados quando comparados aos tumores MSI-*high* (PAWLIK; RAUT; RODRIGUEZ-BIGAS, 2004; MOJARAD et al., 2016). É possível inclusive que MSI-*low* não represente uma entidade distinta, mas sim uma limitação do painel de marcadores microssatélites utilizado em detectar MSI-*high* (LAIHO et al., 2002; TOMLINSON et al., 2002). O gene *MSH6*, por exemplo, não está envolvido no reparo de malpareamento em microssatélites dinucleotídeos. Logo, o uso de painéis como o de Bethesda, em que 3 dos 5 marcadores são dinucleotídeos, pode não ter sensibilidade suficiente para detectar MSI-*high* em tumores com perda de *MSH6* (YOU et al., 2010). Por isso, é recomendado o uso de um segundo painel com marcadores monocucleotídeos para melhor avaliação de tumores MSI-*low* (DESCHOOLMEESTER et al., 2006; ZHANG, 2008; PAGIN et al., 2013).

Alternativamente, pode-se pesquisar a expressão das proteínas de reparo através de imunoistoquímica do tecido tumoral. A ausência da expressão de uma ou mais das proteínas é um sinal indicativo de dMMR e deve ser interpretada com cautela para identificação do gene envolvido (SHIA, 2008). As proteínas MLH1 e MSH2 são parceiras obrigatórias nos seus heterodímeros; logo, anormalidades na sua expressão resultam em degradação proteolítica de todo o dímero, com conseqüente perda tanto da proteína obrigatória quanto da secundária. O mesmo não acontece quando há anormalidade das proteínas secundárias (*MSH6* e *PMS2*). Logo, mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* geralmente resultam na perda concomitante de MLH1/*PMS2* e MSH2/*MSH6* na imunoistoquímica, respectivamente. Mutações nos genes *MSH6* e *PMS2* levam à perda isolada das proteínas homônimas (SHIA, 2008). Padrões equívocos de perda de proteínas de reparo, ou forte suspeita clínica de síndrome de Lynch a despeito de IHQ normal, devem desencadear a solicitação de pesquisa molecular de MSI (SHIA, 2008; ZHANG, 2008).

Conforme já citado, inativação epigenética do gene *MLH1* por hipermetilação da sua região promotora é a causa mais comum de instabilidade de microssatélites (BOLAND; GOEL, 2010; LYNCH et al., 2008; WHEELER, 2005). Logo, nos casos em que a IHQ demonstra perda das proteínas MLH1/*PMS2*, é importante fazer a diferenciação entre casos esporádicos e síndrome de Lynch. Essa diferenciação

pode ser feita através do pesquisa de metilação da região promotora de *MLH1* ou por pesquisa da mutação *BRAF V600E* (LOUGHREY et al., 2007). A presença dessa mutação praticamente descarta a hipótese de SL, enquanto a sua ausência (assim como a ausência de metilação de *MLH1*) devem levar à pesquisa de mutação germinativa de *MLH1* (WEISSMAN et al., 2011). Para os demais genes relacionados com a síndrome, não são conhecidos mecanismos esporádicos de inativação, exceto pela possibilidade de inativação bialélica somática (GEURTS-GIELE et al., 2014; MENSENKAMP et al., 2014). Portanto, perdas referentes às proteínas PMS2, MSH6 ou MSH2/MSH6 na IHQ são relacionadas a SL até prova em contrário (DE JONG et al., 2004).

O último e mais certo passo da investigação molecular da SL, que em última instância é o que permite que o paciente seja rotulado como portador da síndrome de forma definitiva, é a identificação da mutação causal. Os métodos realizados para identificação de mutações são genericamente chamados de testes genéticos. Testes genéticos em geral podem ser realizados de forma direcionada para apenas um gene ou um pequeno grupo de genes, usando como guia o fenótipo do paciente (ou, no caso da SL, o resultado da IHQ) – nesse caso, fala-se em “pesquisa gene-a-gene”; ou englobando uma quantidade maior de genes – muitas vezes, todos os genes conhecidamente relacionados com um determinado fenótipo – nesse caso, são utilizados os chamados “painéis multigene” (HALL et al., 2014). Devido à grande escalada da tecnologia de sequenciamento representada pelo surgimento do sequenciamento de próxima geração (NGS – do inglês, *next generation sequencing*) e consequente queda importante dos custos de sequenciamento por megabase (WETTERSTRAND, 2016), os painéis multigene têm progressivamente ganhado espaço na prática clínica, por se mostrarem mais custo-efetivos (HALL et al., 2014; GALLEGGO et al., 2015). Além disso, a sobreposição de fenótipos entre as síndromes de predisposição causadas por diferentes genes, além do reconhecimento da ampliação dos espectros clássicos que vem ocorrendo com o uso mais amplo dos painéis multigene, favorecem essa estratégia (YURGELUN et al., 2015; ROHLIN et al., 2017).

Quando da detecção de uma variante por teste genético, esse achado deve ser classificado quanto à sua consequência funcional e, por conseguinte, seu impacto clínico. O sistema de classificação mais frequentemente empregado é o sistema de cinco categorias proposto pelo *American College of Medical Genetics*

(ACMG), a saber: 1) variantes benignas; 2) variantes provavelmente benignas; 3) variantes de significado incerto (VUS – do inglês, *variant of uncertain significance*); 4) variantes provavelmente patogênicas; 5) variantes patogênicas (RICHARDS et al., 2015). Os termos “provavelmente benignas” e “provavelmente patogênicas” representam um nível de certeza maior de 90% que a variante seja benigna ou causadora de doença, respectivamente, e para fins práticos tais variantes são tratadas de maneira similar às variantes benignas e patogênicas (PLON et al., 2008; RICHARDS et al., 2015). A inclusão de uma quantidade progressivamente maior de genes nos painéis tem levado a taxas de detecção crescentes de VUS, e isso constitui um desafio na prática clínica. No caso da SL, VUS representam 20-30% de todas as variantes detectadas em testes clínicos incluindo os genes MMR (SIJMONS; GREENBLATT; GENUARDI, 2013).

Em relação ao genótipo dos portadores da SL, há uma grande heterogeneidade, com mais de 3000 variantes dos genes MMR já descritas desde o início da década de 1990 (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2013). Mutações nos genes *MLH1* e *MSH2* são responsáveis pela maioria dos casos da síndrome, respondendo sozinhos por 80-90% das variantes patogênicas identificadas. *MSH6* é o gene causal em cerca de 10% dos casos, enquanto *PMS2* responde por menos de 6% dos casos (KOHLMANN; GRUBER, 2004; GIARDIELLO et al., 2014).

Sobre o tipo de mutação mais comum nos pacientes com SL, embora a maioria das mutações patogênicas dos genes de reparo sejam do tipo *nonsense*, *frameshift* e *missense*, sendo, portanto, detectáveis por técnica de sequenciamento, uma parcela dos casos tem como causa variação do número de cópias (CNV – do inglês, *copy number variation*) num dos genes reparo (GRADY, 2005; PELTOMÄKI, 2016). A porcentagem de casos causados por CNV varia para cada gene, sendo menor para o gene *MSH6* (<5%) e maior para os genes *MSH2* (cerca de 20%) e *PMS2* (até 40-50%). Para o gene *MLH1*, estima-se cerca de 10% de grandes deleções/duplicações (KOHLMANN; GRUBER, 2004; SMITH et al., 2016). Nesses casos, a identificação da mutação causal não é possível através de técnicas de sequenciamento simples, sendo necessários métodos específicos para análise de CNV, como MLPA (do inglês, *multiplex ligation-dependent probe amplification*) e técnicas de microarranjo (SMITH et al., 2016). Alguns dos painéis baseados em NGS comercialmente disponíveis já estão validados para análise de CNV (LINCOLN et al., 2015). Logo, só podemos considerar que a investigação molecular de um

paciente com suspeita de SL está completa se o teste genético realizado contemplou análise de CNV (NCCN, 2019a).

Estudos de caracterização molecular da SL no Brasil e América do Sul mostram que, assim como no restante do mundo, os genes mais comumente afetados são *MLH1* e *MSH2*, com alguma variação de predominância entre eles (ROSSI et al., 2002; VALENTIN et al., 2011; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2013; DA SILVA et al., 2015). Mutações do tipo *nonsense* e *frameshift* são as mais comuns, o que também está de acordo com os achados em outras populações (VALENTIN et al., 2011; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2013; SCHNEIDER et al., 2018) Do ponto de vista clínico, um desses estudos, envolvendo indivíduos de 116 famílias registradas no Banco de Dados de Câncer Colorretal Hereditário do Hospital A.C. Camargo, também está em concordância com a literatura: em portadores da SL, o tumor mais frequente foi o de cólon direito; a taxa de tumores sincrônicos ou metacrônicos foi de 25%; e o sítio primário extracolônico mais comum foi o endométrio (DA SILVA et al., 2015). Os dados referentes à caracterização de famílias brasileiras com síndrome de Lynch ainda são relativamente escassos na literatura. O compartilhamento dos achados genotípicos e fenotípicos de novas coortes de pacientes deve ser estimulado, pois contribui com a possibilidade de consolidação de um banco de dados nacional ou continental, e traz avanços na área de pesquisa do câncer colorretal hereditário no nosso meio (ROSSI et al., 2016).

2.2.6 Nomenclatura: a importância da padronização dos termos

Historicamente, os termos HNPCC e síndrome de Lynch têm sido utilizados de forma sinônima na denominação dos portadores da síndrome, sendo comum a citação “HNPCC/Síndrome de Lynch”. O uso sinônimo do termo HNPCC foi inclusive sugerido pela primeira vez pelo próprio Dr. Lynch em 1985 e, portanto, foi obviamente muito bem aceito por muitos anos (LYNCH et al., 1985; BOLAND; LYNCH, 2013). Nessa descrição original, definiu-se que famílias categorizadas como HNPCC seriam aquelas preenchendo os seguintes critérios: 1) CCR diagnosticado em idade jovem; 2) tumores de localização predominantemente proximal; 3) frequência aumentada de vários tumores, inclusive endometriais; 4) taxas melhores de sobrevida em 5 anos para CCR quando comparado aos dados do *American College of Surgeons* para pacientes com o mesmo estágio clínico (EC) (LYNCH et

al., 1985). Com o conhecimento molecular atual, sabemos que nem todo paciente preenchendo os critérios acima apresenta mutação germinativa num dos genes de reparo. Mais do que isso, nem todo paciente preenchendo esses critérios terá sequer instabilidade de microssatélites detectada no seu tumor, o que deveria ser uma condição *sine qua non* para SL. Por isso, com a descoberta da base genética da síndrome e, principalmente, com o reconhecimento de que nem toda aglomeração familiar de CCR em idade jovem representa uma mesma doença, opta-se atualmente pelo emprego do termo síndrome de Lynch exclusivamente para as famílias que tem mutação germinativa detectada num dos genes de reparo (BOLAND, 2005; BOLAND; LYNCH, 2013).

Uma vez observada a discordância entre os critérios clínicos impostos e os achados moleculares, esses parâmetros foram então dissociados. Atualmente, o termo HNPCC é definido clinicamente, em geral guiado pelos critérios de Amsterdam I e II (JASS, 2006). Na “lacuna” criada entre os critérios clínicos isolados e o achado da mutação germinativa, o amplo conhecimento molecular atual criou a possibilidade de definição de várias outras entidades. Apesar de a abundância de termos eventualmente criar uma resistência inicial, a perspectiva de uniformização da terminologia que define cada possível combinação de achados é muito interessante do ponto de vista científico e até de manejo clínico (KRAVOCHUCK et al., 2014).

Basicamente, a SL pode ser vista sob três dimensões: 1) a história familiar, representada pelos critérios de Amsterdam; 2) os achados moleculares somáticos, caracterizados pela instabilidade de microssatélites ou dMMR; 3) o achado germinativo, caracterizado pela presença de mutação de um dos genes de reparo. Esses três aspectos podem se apresentar em qualquer combinação e diferentes combinações caracterizam diferentes entidades (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017).

Iniciando pelo aspecto mais definitivo: a detecção de mutação germinativa patogênica ou provavelmente patogênica num dos genes de reparo define a síndrome de Lynch. A família desses pacientes não necessariamente preencherá critérios de Amsterdam, já que a sensibilidade desses critérios é bastante limitada – em torno de 60% (SYNGAL et al., 2000). Apesar de a deficiência do sistema de reparo de malpareamento ter como consequência teórica a instabilidade de microssatélites, sabemos que nem a pesquisa molecular nem a IHQ tem sensibilidade de 100%. Logo, a presença de mutação germinativa é soberana e independente dos demais critérios (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017).

Os critérios de Amsterdam I e II também não são específicos da SL. Estudos demonstram que apenas 50-60% dos pacientes preenchendo esses critérios tem mutação germinativa deletéria detectada. Hoje sabemos que para a outra metade desses pacientes com HNPCC, não é possível demonstrar deficiência do sistema de reparo nem por teste molecular, nem por imunistoquímica. Pacientes pertencentes a famílias que preenchem critérios clínicos de Amsterdam I ou II (HNPCC), mas cujos tumores não demonstram dMMR, são denominados clinicamente como portadores de “Câncer Colorretal Familiar do Tipo X” (CCFTX) (LINDOR, 2009). Essa denominação engloba um grupo de famílias provavelmente heterogêneas do ponto de vista genético, mas apesar do substrato molecular indefinido e provavelmente variado, destaca-se a sua importância clínica ao passo que esses pacientes parecem estar sob risco menor do que os pacientes com síndrome de Lynch para câncer colorretal (LINDOR et al., 2005). O diagnóstico de CCFTX exige muita atenção para evitar algumas possíveis armadilhas, como: 1) ocorrência de uma fenocópia dentro de uma família com SL; 2) SL causada pelo gene *MSH6*; 3) resultado falso negativo da pesquisa molecular de MSI ou da IHQ – nesse último caso, apesar da alta taxa de concordância entre os dois exames, sugere-se que sejam realizados ambos os métodos (LINDOR, 2009). Em última instância, na suspeita clínica de câncer hereditário a realização de teste genético (germinativo) não deve ser indeferida por se tratar de tumor MSS, podendo se detectar inclusive casos de SL (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017).

Pacientes cuja história familiar preenche critérios de Amsterdam, cujo tumor tem MSI-*high* demonstrada, porém não tem mutação germinativa detectada no teste genético são definidos como Lynch-*like* ou *likely*-Lynch (CARETHERS, 2014; KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017; RODRÍGUEZ-SOLER et al., 2013). Existem duas principais possíveis explicações para esses casos: 1) presença de mutação germinativa em genes ainda desconhecidos que leva à MSI-*high* (XAVIER et al., 2019); 2) presença de mutação germinativa nos genes MMR não detectável pelos métodos atuais. Independente da causa, nesses casos parece prudente manter o plano de rastreamento semelhante ao realizado para pacientes com síndrome de Lynch (CARETHERS, 2014).

Finalmente, a última possibilidade seria a ocorrência de um tumor MSI-*high* num paciente sem história familiar preenchendo critérios de Amsterdam e sem mutação germinativa detectada nos genes MMR. A terminologia usada para definir

esses casos seria tumor-Lynch, ou seja: apenas o tumor é semelhante àqueles da síndrome de Lynch, mas a história familiar e o teste genético não concordam com essa hipótese (KRAVOCHUCK; CHURCH, 2017). A explicação mais provável para esses casos seria ocorrência de inativação bialélica somática de um dos genes de reparo e, por se tratar de evento esporádico, esses casos não necessitariam de seguimento diferenciado (SOURROUILLE et al., 2013; GEURTS-GIELE et al., 2014; MENSENKAMP et al., 2014). Fica então bem demonstrado que as condutas diferem amplamente entre esses diferentes casos, e que a categorização que dá origem à nomenclatura é útil tanto para auxiliar no entendimento dos mecanismos de doença quanto para definição de manejo clínico (KRAVOCHUCK et al., 2014).

2.2.7 A instabilidade de microssatélites como alvo terapêutico

A deficiência do sistema MMR não apenas promove a tumorigênese, mas também contribui com a formação de neoantígenos tumorais (WILLIS et al., 2020). Conforme previamente discutido, a perda da função do sistema MMR leva à ocorrência de pequenas inserções/deleções (*indels*), especialmente em regiões de DNA microssatélite. Essas mutações causam mudança do quadro de leitura durante o processo de tradução, resultando geralmente em um peptídeo truncado e não funcional. Além da perda de função da proteína envolvida, a mudança do quadro de leitura leva ao surgimento de uma nova sequência de aminoácidos, inteiramente diferente da original (WILLIS et al., 2020). Portanto, os neoantígenos resultantes dessas *indels* são resultado da alteração de longos trechos de aminoácidos, que podem então conter múltiplos neoepítomos imunologicamente relevantes (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016). A presença de peptídeos antigênicos estimula a infiltração linfocítica e a superexpressão de citocinas inflamatórias no microambiente tumoral (WILLIS et al., 2020). Além disso, esses neoantígenos são tumor-específicos, visto que surgem apenas nos clones tumorais emergentes, sendo completamente novos e desconhecidos para o sistema imune do hospedeiro – isso faz dos tumores MSI-*high* alvos perfeitos para uma resposta imune específica e direcionada (KLOOR; VON KNEBEL DOEBERITZ, 2016).

A percepção do microambiente tumoral como uma entidade imunologicamente ativa fez desse tópico um campo de pesquisa fértil, com descobertas que vem se desdobrando em alternativas terapêuticas promissoras

(PARDOLL, 2002). Dentro desse mesmo contexto, a não obtenção das respostas esperadas de uma maneira consistente levaram ao estudo e à elucidação de mecanismos que permitem que as células neoplásicas escapem da resposta imune.

Sabemos que a interação de células T com ligantes cossinalizadores pode modular a resposta imunológica. De acordo com o desfecho funcional dessa interação, as moléculas cossinalizadoras podem ser classificadas em coestimuladoras ou coinibidoras (CHEN, 2004). Sendo assim, o reconhecimento de um antígeno apresentado pelo complexo principal de histocompatibilidade (MHC – do inglês, *major histocompatibility complex*) pelo receptor de célula T (TCR – do inglês, *T cell receptor*) não determina por si só a resposta imune. A direção da resposta é guiada por essas moléculas cossinalizadoras, presentes nas células apresentadoras de antígenos ou em outras células do hospedeiro (CHEN, 2004; SCHILDBERG et al., 2016). As vias de cossinalização exercem o importante papel de promover imunidade protetora enquanto mantêm a tolerância ao próprio, prevenindo a autoimunidade. A modulação terapêutica dessas vias está se traduzindo em estratégias efetivas para o tratamento do câncer, de doenças autoimunes e infecciosas, além de rejeição a transplantes (SCHILDBERG et al., 2016).

Entre as vias cossinalizadoras do sistema imune descritas, está o eixo B7-H1/PD-1. A família B7 consiste num grupo de moléculas coinibidoras e coestimuladoras que regulam a resposta imune (ZOU; CHEN, 2008). Atualmente, a família conta com 10 membros, sendo eles: CD80, CD86, B7-DC, B7-H1, B7-H2, B7-H3, B7-H4, B7-H5, B7-H6 e B7-H7 (NI; DONG, 2017). Os sinais inibitórios são em grande parte associados aos membros B7-H4 e B7-H1 – este último também conhecido como PD-L1 – do inglês, *programmed death-ligand 1* (ZOU; CHEN, 2008). O eixo B7-H1/PD-1 está envolvido na regulação negativa das respostas celular e humoral, através da ativação de morte celular programada de células T e B, sendo portanto um mecanismo de evasão imune (CHEN, 2004; DONG et al., 2002). Essa via foi originalmente identificada em um hibridoma de células T passando por morte celular programada e descrita por uma equipe liderada por Tasuku Honjo, da Universidade de Kyoto (ISHIDA et al., 1992). Anos depois, em 2018, o mesmo Dr. Honjo foi o ganhador do prêmio Nobel de Medicina, em conjunto com Dr. James Allison, pela contribuição das suas descobertas para o advento da imunoterapia para o tratamento do câncer (HUANG; CHANG, 2019).

As primeiras pesquisas translacionais especulando a possibilidade de bloqueio da via PD-1/PD-L1 no tratamento do câncer datam do início dos anos 2000 (DONG et al., 2002; IWAI et al., 2002). Os resultados sugeriam que a expressão de PD-L1 na superfície de células tumorais funciona como um mecanismo para que tumores potencialmente imunogênicos escapem da resposta imune do hospedeiro, e que o bloqueio da interação entre PD-1 e PD-L1 com o uso de anticorpos monoclonais poderia ser uma estratégia de imunoterapia específica contra as células tumorais. Como a interação entre PD-1/PD-L1 leva à regulação negativa da resposta imune, este eixo está entre as vias conhecidas como vias de *checkpoint* imune; portanto, as drogas que agem no seu bloqueio são também conhecidas como inibidores de *checkpoint* (PARDOLL, 2012).

Em 2012, foi apresentado no congresso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO – do inglês, *American Society of Clinical Oncology*) um resumo com os resultados do primeiro ensaio clínico em humanos utilizando uma droga anti-PD-1 (PATNAIK et al., 2012). A droga MK-3475, inicialmente chamada de lambrolizumabe e hoje conhecida como pembrolizumabe, é um anticorpo monoclonal IgG4 humanizado anti-PD-1. Nesse primeiro estudo, ela foi bem tolerada e demonstrou evidência de atividade antitumoral em pacientes com tumores sólidos avançados. Já em abril de 2013, o então lambrolizumabe recebeu do FDA a designação de “*breakthrough therapy*” (ou “terapia inovadora” – tradução livre) para o tratamento de pacientes com melanoma avançado. Essa designação visa garantir prioridade ao desenvolvimento e avaliação de drogas candidatas ao tratamento de doenças potencialmente fatais, quando existem evidências clínicas preliminares de que a droga em questão possa oferecer melhores resultados em comparação às terapias existentes.

Apesar de atingir respostas bastante significativas numa ampla gama de tumores (ROBERT; SORIA; EGGERMONT, 2013), inicialmente ficou incerto qual seria a característica ou o marcador que definiria quais tumores seriam bons respondedores ao bloqueio de PD-1. A expressão de PD-L1 na superfície das células tumorais se demonstrou um marcador importante, mas não definitivo (TOPALIAN et al., 2012). Em 2015, foi publicado o estudo que seria o primeiro passo na direção da primeira aprovação agnóstica da história do FDA: a instabilidade de microssatélites foi revelada como um importante marcador de resposta ao inibidor de *checkpoint* anti-PD-1 (LE et al., 2015). Essa descoberta está em perfeita

consonância com todas as características que a deficiência do sistema MMR traz, previamente aqui discutidas. A alta taxa de mutações somáticas, a formação de neoantígenos tumor-específicos e a infiltração linfocítica, que são características compartilhadas pelos tumores MSI-*high* em geral, explicam a maior suscetibilidade desses tumores à imunoterapia (DUDLEY et al., 2016).

Finalmente, em 23 de maio de 2017, ocorreu o grande marco da era da medicina de precisão no tratamento do câncer: o FDA concedeu sua primeira aprovação sítio-agnóstica para uma droga. O anticorpo anti-PD-1 pembrolizumabe teve seu uso aprovado para pacientes adultos ou pediátricos com tumores sólidos, metastáticos ou irresssecáveis, cujo tumor apresente deficiência de proteínas de reparo na IHQ ou MSI-*high* na pesquisa molecular, independente do sítio de origem ou da histologia (LEMERY; KEEGAN; PAZDUR, 2017). O termo agnóstico vem do grego *agnosto* – “não conhecido”, fazendo referência ao fato de a indicação ser baseada exclusivamente na presença do biomarcador molecular, sem necessidade de se conhecer o sítio de origem ou a histologia do tumor.

A aprovação do uso agnóstico do pembrolizumabe em pacientes com tumores MSI-*high* colocou a SL em evidência. A indicação de pesquisa de MSI em todos os tumores colorretais e endometriais já faz parte dos protocolos NCCN desde 2016, tendo como objetivo melhorar a sensibilidade na identificação de pacientes com SL (NCCN, 2019a). Apesar disso, o rastreamento universal não é a realidade de grande parte dos serviços e as taxas de não aderência a essa estratégia é bastante significativa (SHAIKH et al., 2018). No cenário pós-pembrolizumabe, a pesquisa de MSI ganha a importância adicional de possivelmente trazer um achado clinicamente acionável para pacientes com doença avançada (YURGELUN; HAMPEL, 2018). Esse novo *status* impulsiona, indiretamente, a identificação de mais pacientes com SL, inclusive no contexto de tumores não previamente relacionados com a síndrome, contribuindo para uma melhor compreensão do espectro de tumores (LATHAM et al., 2019).

Além da imunoterapia com inibidores de *checkpoint*, outra perspectiva promissora – mas ainda não disponível clinicamente – para os pacientes com SL é o desenvolvimento de uma vacina contra neopeptídeos antigênicos presentes nos tumores MSI-*high*. Essa abordagem teria o potencial não só de tratar e prevenir recidivas em pacientes que já apresentaram tumor, mas também de possivelmente servir como imunoprevenção primária em pacientes saudáveis portadores de

mutação (MAJUMDER et al., 2018; VON KNEBEL DOEBERITZ; KLOOR, 2013; YURGELUN; HAMPEL, 2018).

2.2.8 Aconselhamento genético e manejo na síndrome de Lynch

A SL é uma das síndromes de predisposição hereditária a câncer mais comuns (ACOG, 2019) e, por isso, uma das mais frequentemente vistas na prática clínica. A identificação de pacientes com síndrome de Lynch e a sua inserção em programas de rastreamento resultam numa significativa diminuição da incidência e da mortalidade por CCR (JÄRVINEN et al., 2000; DE JONG et al., 2006; ENGEL et al., 2010), reforçando a importância do reconhecimento da síndrome.

Conforme previamente discutido, atualmente os protocolos NCCN recomendam que todo tumor colorretal seja rastreado com IHQ e/ou pesquisa molecular de MSI, visando um aumento da sensibilidade diagnóstica para SL; para esse rastreamento universal, não há recomendação de aconselhamento genético prévio (NCCN, 2019a). No caso de obtenção de resultados anormais (vide tópico 2.2.5), está indicado aconselhamento com um indivíduo com *expertise* em genética antes de que seja oferecido teste germinativo (NCCN, 2019a).

O aconselhamento genético (AG) é definido como o processo de comunicação que ajuda o paciente a entender e se adaptar às implicações médicas, psicológicas e familiares das doenças hereditárias. Esse processo deve incluir a interpretação da história pessoal e familiar; educação sobre tipos de herança, teste genético, manejo, prevenção, recursos disponíveis e pesquisa; e aconselhamento para promover escolhas informadas e adaptação aos riscos trazidos pela condição (RESTA et al., 2006). Essa é uma definição geral, mas que se aplica também às síndromes de predisposição hereditária ao câncer, como a SL.

Em relação às estratégias de prevenção, os principais protocolos internacionais contêm hoje recomendações referentes aos seguintes sítios: colorretal, endométrio, ovário, estômago, duodeno e vias urinárias (BALMAÑA et al., 2013; VASEN et al., 2013; SYNGAL et al., 2015; KANTH et al., 2017; NCCN, 2019). Para fins de padronização, citaremos aqui as recomendações da NCCN, ressaltando que as orientações de todas as entidades são, em geral, bastante semelhantes entre si.

Para prevenção do CCR, recomenda-se que os pacientes com SL realizem colonoscopia a cada 1 a 2 anos, iniciando aos 20-25 anos ou 5 anos antes da idade mais precoce de diagnóstico de CCR na família (NCCN, 2019a). Embora a ocorrência de câncer de intervalo – ou seja, tumores diagnosticados no intervalo entre colonoscopias que era considerado adequado para um determinado paciente – não seja inexistente (HAANSTRA et al., 2013), a retirada preventiva de um cólon saudável (ou profilaxia primária) não é, atualmente, uma estratégia recomendada para esses pacientes. Já no caso de um paciente sabidamente portador de mutação ser diagnosticado com tumor colorretal, hoje recomenda-se que seja considerada a extensão da colectomia (NCCN, 2019a), ou seja: ao invés da ressecção oncológica apenas da porção do cólon acometida pelo tumor, seria realizada a ressecção completa do cólon (colectomia total/subtotal). Essa alternativa, definida como profilaxia secundária, visa evitar a ocorrência de CCR metacrônico, e deve ser discutida com o paciente para uma tomada de decisão conjunta (CHURCH, 2016).

Os tumores ginecológicos são uma importante preocupação para as mulheres com SL. O risco cumulativo ao longo da vida pode chegar a 70% para câncer de endométrio e 20% para tumores de ovário (GIARDIELLO et al., 2014). Ao contrário do sítio colorretal, que conta com um exame altamente eficaz para prevenção de tumores, não há evidência de que exames de rastreamento para câncer de endométrio ou ovário tragam benefícios. As pacientes devem ser educadas em relação aos sintomas de alerta, como sangramento uterino anormal ou pós-menopausa, dor abdominal, plenitude, saciedade precoce e mudança da frequência urinária. Ultrassom transvaginal e dosagem do marcador tumoral CA-125 podem ser considerados, mas não têm comprovação de sensibilidade e especificidade suficientes para que sejam recomendados de rotina. Logo, a retirada preventiva desses órgãos (histerossalpingo-ooforectomia bilateral redutora de risco) deve ser discutida como uma opção para essas pacientes, com atenção a aspectos como constituição da prole/planejamento familiar, presença de comorbidades, história familiar de tumores ginecológicos e gene envolvido (discussão adiante) (NCCN, 2019a).

Para o seguimento de estômago e duodeno, embora não haja clara evidência de benefício, preconiza-se realização de endoscopia digestiva alta com avaliação do duodeno a cada 3-5 anos, a partir dos 30-35 anos de idade. Para os tumores uroteliais, as evidências também são limitadas, mas recomenda-se que seja

realizado exame de urina anual a partir dos 30-35 anos, especialmente em pacientes do sexo masculino com mutação de *MSH2* (NCCN, 2019a).

Sobre a questão do gene envolvido, nos últimos anos vem sendo trazida à tona a percepção de que os riscos relacionados aos diferentes genes de reparo não são exatamente os mesmos (SENER et al., 2008; WIN et al., 2012). O principal gene que se “destaca” dos demais é o *PMS2*, pois múltiplos estudos demonstram uma incidência muito menor de CCR para esses pacientes (em torno de 20% de risco cumulativo ao longo da vida); os tumores extracolônicos também são muito menos frequentes (SENER et al., 2008; MØLLER et al., 2017; TEN BROEKE et al., 2018; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020). O gene *MSH6* também parece trazer um risco marcadamente menor de CCR ao longo da vida, com dados discordantes sobre a incidência de câncer de endométrio (BONADONA et al., 2011; MØLLER et al., 2018; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020). Os genes *MLH1* e *MSH2* são, consensualmente, os que estariam relacionados aos riscos mais altos, sendo *MSH2* particularmente associado a um maior risco de tumores extracolônicos, em especial os de vias urinárias (JOOST et al., 2015; MØLLER et al., 2018; DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020).

A partir de 2016, o protocolo da NCCN oficialmente reconhece os riscos mutação-específicos, mas reforça ainda não haver evidência suficiente para recomendação formal de manejo diferencial guiado pelo genótipo (NCCN, 2019a). Ainda assim, o manual sugere a possibilidade de discussão individualizada sobre as cirurgias redutoras de risco de acordo com o gene causal (citando, por exemplo, que não há evidência suficiente para apoiar a ooforectomia redutora de risco para os portadores de mutação de *MSH6* e *PMS2*); a possibilidade de início mais tardio das colonoscopias para portadores de mutação em *MSH6* (indicação não extensiva a *PMS2* por dados insuficientes); e intervalo entre colonoscopias de um ano em detrimento de dois anos para portadores de mutação em *MLH1* e *MSH2* (NCCN, 2019a). Conforme as evidências que apoiam essas diferenças aumentam, a tendência é que os protocolos de manejo para a SL passem por revisão e adaptação aos novos dados (DOMINGUEZ-VALENTIN et al., 2020).

Além das estratégias redutoras de risco discutidas até aqui, a quimioprevenção com uso de aspirina já demonstrou trazer benefícios para os pacientes com SL, levando à diminuição na incidência de CCR e tumores de outros sítios relacionados à síndrome (BURN et al., 2011). Esse benefício foi demonstrado

por um ensaio clínico controlado e randomizado, o *CAPP2 Trial - Colorectal Adenoma/Carcinoma Prevention Programme*. Porém, a principal limitação do estudo foi a dose de aspirina utilizada – 600 mg, uma dose bastante elevada e potencialmente tóxica – e a proteção contra câncer não foi vista para pacientes que fizeram uso da medicação por menos de 2 anos (BURN et al., 2008, 2011). Atualmente, está em andamento o estudo *CAPP3 (Cancer Research UK Trial número CRUK/12/039)*, que visa definir se as doses de 100 ou 300 mg apresentam o mesmo efeito protetor da dose mais alta. Os resultados desse estudo estão previstos para 2024. A recomendação da NCCN é de que a aspirina pode ser utilizada visando prevenção de câncer nos pacientes com SL, embora a duração da terapia e a dose ideal ainda sejam desconhecidas; muitos médicos optam por prescrever doses menores que 600 mg (NCCN, 2019a).

É fundamental que os familiares em risco de um paciente diagnosticado com mutação germinativa sejam aconselhados e testados (teste em cascata), visando estender os benefícios do diagnóstico ao maior número de indivíduos possível, otimizando a custo-efetividade do processo (LADABAUM et al., 2011; HAMPEL, 2016; NIKOLAIDIS et al., 2019). Porém, dados da literatura e a própria prática clínica nos mostram que o teste em cascata é subutilizado (SHARAF et al., 2013), e os pacientes costumam estar mais propensos a informar seus resultados apenas para parentes de primeiro grau (pais, filhos e irmãos), excluindo os familiares mais distantes desse processo (HAMPEL, 2016). Alguns dos motivos citados na literatura norte-americana como dificultadores do teste em cascata são: preocupações com o seguro de saúde; medo da discriminação genética; privacidade e custo (SHARAF et al., 2013).

Finalmente, pacientes com SL em idade reprodutiva devem também ser aconselhados no tangente às suas opções de diagnóstico pré-natal e reprodução assistida (NCCN, 2019a). Além disso, casais nos quais ambos são portadores de mutação no mesmo gene de reparo devem ser aconselhados quanto à chance de uma rara síndrome recessiva: a deficiência constitucional/bialélica de proteínas de reparo (OMIM #276300). A maior série de casos de deficiência bialélica de proteínas MMR inclui apenas 35 casos, originados de 7 diferentes países (ARONSON et al., 2016). Diferentemente da SL, essa condição traz risco de tumores já na primeira infância, com uma morbimortalidade significativa (WIMMER et al., 2014; ARONSON et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Caracterizar aspectos clínicos e moleculares das famílias com diagnóstico de síndrome de Lynch desde a implantação do Serviço de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar descrição fenotípica dos pacientes afetados, incluindo sítio primário dos tumores diagnosticados, idade ao diagnóstico, tipo histológico, estadiamento, presença de tumores sincrônicos ou metacrônicos.
- Correlacionar estes dados com aspectos moleculares disponíveis, incluindo o resultado da imunistoquímica para proteínas de reparo nos tumores, assim como da pesquisa de instabilidade de microssatélites e dos testes genéticos, quando realizados.
- Avaliar a sensibilidade dos critérios diagnósticos de Amsterdam I/II nesse grupo de pacientes.
- Avaliar o acesso dos pacientes do Sistema Único de Saúde aos métodos de diagnóstico molecular da Síndrome de Lynch.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esse projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Erasto Gaertner (CAAE: 65971917.0.0000.0098).

4.1 COLETA DE DADOS

Os prontuários dos pacientes atendidos pelo Serviço de Oncogenética de Junho/2012 a Dezembro/2018 foram revisados, selecionando-se inicialmente os pacientes com diagnóstico de tumores incluídos no espectro da síndrome de Lynch (colorretal, endométrio, estômago, ovário, ureter, pelve renal, vias biliares, intestino delgado, pâncreas, adenoma de glândulas sebáceas ou ceratoacantoma). Também foram identificados nessa avaliação inicial todos os pacientes que tenham realizado teste genético, independente da história pessoal ou familiar, para garantir a inclusão de todos os pacientes cujos testes tenham detectado mutação germinativa em um dos genes de reparo.

Os heredogramas que constam no prontuário manual desses pacientes inicialmente selecionados foram revisados para identificar aqueles que preenchem os critérios de inclusão, que são:

- 1) pacientes cuja família preenche os critérios de Amsterdam I/II E com tumor apresentando instabilidade de microssatélites ou ausência de qualquer(isquer) proteína(s) de reparo na imunoistoquímica OU;
- 2) pacientes cujo tumor apresenta ausência de proteína(s) de reparo compatível com perda de expressão dos genes *MSH2*, *MSH6* ou *PMS2*, independente da história familiar OU;
- 3) pacientes cujo tumor apresenta ausência de proteínas de reparo compatível com perda de expressão do gene *MLH1*, mas com características sugestivas de hereditariedade, que aqui serão representadas pelos critérios de Bethesda OU;
- 4) pacientes que realizaram teste genético com resultado demonstrando mutação germinativa (patogênica ou provavelmente patogênica) num dos genes de reparo.

Foram excluídos:

- 1) pacientes cujos prontuários estavam incompletos e não apresentavam heredograma ou dados de história familiar que permitissem caracterizá-los dentro de um dos critérios de inclusão OU;
- 2) pacientes que, mesmo que suspeitos clinicamente, tenham resultado de IHQ normal ou tumor MSS, sem ter realizado teste genético para investigação de mutação germinativa (excluindo os casos de CCFTX, mas também eventualmente os casos de SL com resultado de IHQ falso negativo) OU;
- 3) pacientes cuja suspeita diagnóstica, pela história familiar, seja mais compatível com outra síndrome OU;
- 4) pacientes que tenham realizado teste genético que não identificou variante patogênica ou provavelmente patogênica nos genes de reparo (esse critério eventualmente exclui casos *likely*-Lynch e pacientes com SL que realizaram testes genéticos incompletos em termos de sequenciamento e/ou análise de CNV).

Pacientes que realizaram teste genético com resultado demonstrando variantes de significado incerto em genes de reparo foram discutidos separadamente.

Para fins teóricos, é importante ressaltar que apenas pacientes que realizaram teste genético que tenha demonstrado mutação germinativa em um dos genes de reparo podem ser formalmente designados como portadores da síndrome de Lynch (vide tópico 2.2.6), mas nesse trabalho todos os pacientes incluídos pelos critérios acima foram denominados como tal.

Através de revisão dos prontuários, os seguintes dados foram coletados: idade ao diagnóstico, sítio do(s) tumor(es), tipo histológico, estadiamento clínico ou cirúrgico (se disponível), tratamentos realizados, condutas profiláticas, presença de tumores sincrônicos, detecção de tumores metacrônicos durante o seguimento, resultado da imunistoquímica das proteínas de reparo no tumor, resultado da pesquisa de instabilidade de microssatélites no tumor e resultado do teste genético.

No caso de pacientes apresentando mais de um tumor, definimos o primeiro tumor diagnosticado como “tumor índice”. Tumores sincrônicos foram definidos como

aqueles diagnosticados num mesmo momento ou com menos de 12 meses de intervalo entre os seus diagnósticos. Tumores metacrônicos foram definidos como aqueles diagnosticados mais de 12 meses após o diagnóstico do tumor prévio (PARRY et al., 2011).

Para os tumores colorretais, aqueles localizados no ceco, cólon ascendente, flexura hepática, cólon transverso e ângulo esplênico foram definidos como proximais; tumores do cólon descendente, sigmoide e reto foram definidos como distais.

Os exames de imunohistoquímica foram realizados pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner através do SUS, sob solicitação do médico assistente. A pesquisa molecular de instabilidade de microssatélites não é oferecida pelo SUS, assim como teste genético para pesquisa de mutações germinativas relacionadas a predisposição hereditária a câncer. Sendo assim, quando indicada, a realização desses testes depende da disponibilidade financeira do paciente e é realizada em instituições privadas, sem relação direta com o hospital. Para a classificação das variantes detectadas, todos os laboratórios utilizaram a terminologia sugerida pelo ACMG, incluindo cinco categorias, a saber: 1) variantes benignas; 2) variantes provavelmente benignas; 3) variantes de significado incerto; 4) variantes provavelmente patogênicas; 5) variantes patogênicas (RICHARDS et al., 2015).

Para os pacientes que apresentaram resultados de imunohistoquímica incongruentes, foi realizada a revisão das lâminas em parceria com o serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner. Foram considerados resultados incongruentes aqueles com qualquer padrão de perda de proteínas diferente das possibilidades previstas, baseado no conhecimento prévio sobre a interação entre as proteínas de reparo e formação de heterodímeros. Os padrões previstos incluem: a perda isolada de PMS2 ou MSH6 e; perda combinada de MLH1/PMS2 ou MSH2/MSH6 (vide tópico 2.2.3).

4.2 ANÁLISE DOS DADOS

Após a coleta de dados, os aspectos genotípicos e fenotípicos foram correlacionados e descritos. Por análise da proporção do total dos pacientes incluídos que realizou teste genético, foi avaliado o acesso dos pacientes a essa

tecnologia no cenário do Sistema Único de Saúde. Para avaliar a sensibilidade dos critérios de Amsterdam I/II e Bethesda em identificar portadores de mutação germinativa dos genes de reparo, calculamos a proporção de pacientes diagnosticados que preencheram esses critérios.

Os heredogramas apresentados nessa dissertação foram construídos utilizando a ferramenta *online* gratuita Progeny *Pedigree Tool* - 9.101.9047.00, disponível em <https://pedigree.progenygenetics.com/>.

As variáveis quantitativas foram descritas como médias \pm desvio padrão (DP) se distribuição normal e como mediana e intervalo interquartil (IIQ) se distribuição não normal. As variáveis qualitativas foram descritas como frequências (%). Para analisar a significância das diferenças entre variáveis qualitativas em diferentes grupos foram usados o teste Qui Quadrado ou o Teste exato de Fisher, conforme apropriado. Para comparação das variáveis quantitativas, foi usado o teste *t* de Student.

5 RESULTADOS

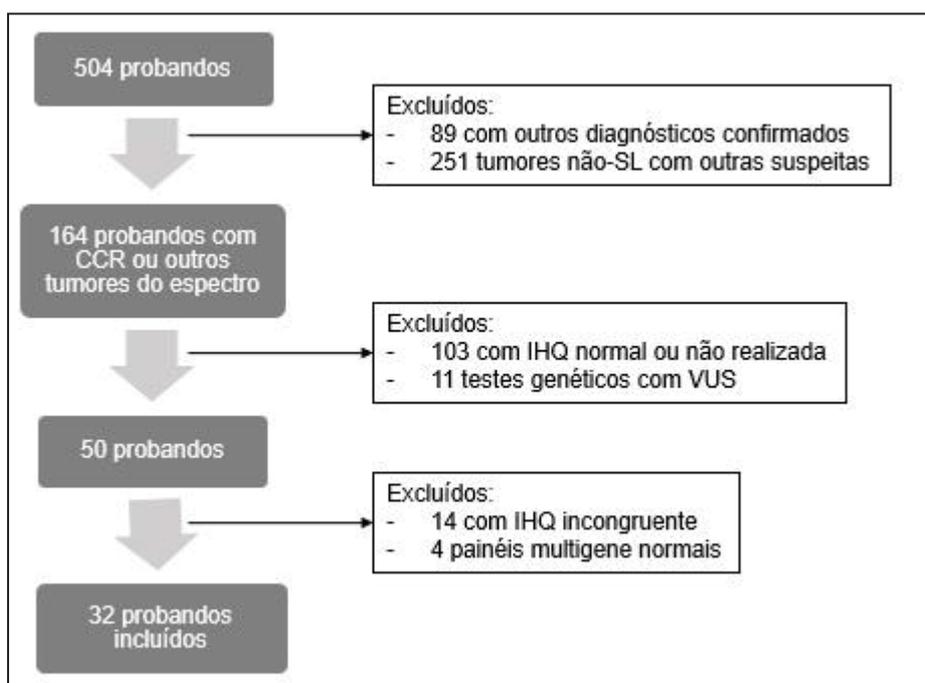
Inicialmente, foram revisados 623 prontuários, sendo 504 probandos e 119 familiares atendidos no ambulatório de Oncogenética do Hospital Erasto Gaertner entre julho de 2012 e dezembro de 2018. A identificação desses pacientes no sistema de prontuários eletrônicos (Philips Tasy) foi feita através da busca pelo código internacional de doenças (CID) Z31.5 – aconselhamento genético. O processo de seleção de pacientes descrito a seguir está sintetizado no fluxograma da Figura 2. Dos 504 probandos, 89 foram prontamente excluídos por terem outros diagnósticos confirmados, seja por critérios clínicos (32 casos) ou por teste molecular (57 casos). Dos 415 casos restantes, todos tiveram seus prontuários revisados para as suas consultas de avaliação com a Oncogenética. Foram então excluídos mais 251 casos de pacientes com tumores não colorretais e não pertencentes ao espectro clássico da síndrome de Lynch, por terem avaliação indicando maior nível de suspeição para outras síndromes de predisposição ou até mesmo para caso esporádico. É importante ressaltar que apenas 50 desses 251 pacientes tinha algum tipo de teste molecular realizado, sendo 48 painéis multigene e 2 exomas clínicos, que não revelaram mutações nos genes de reparo. Mais 103 pacientes foram excluídos por apresentarem tumor com IHQ normal ou IHQ não realizada. Seis dos pacientes cujo tumor apresentou IHQ normal preenchem critérios de Amsterdam I ou II, caracterizando CCCTX. Apenas um deles deu seguimento à investigação com painel multigene, que teve resultado normal. Mais 11 pacientes apresentaram resultado do teste genético demonstrando VUS num dos genes de reparo e serão discutidos separadamente adiante.

Restaram então 50 probandos com tumores colorretais ou outros pertencentes ao espectro clássico da síndrome de Lynch, ou ainda com tumores de outros sítios, mas com testes moleculares apresentando achados relevantes para esse estudo. Desses, 14 tinham resultados de IHQ anormais, mas considerados incongruentes (vide tópico 4.1) e serão discutidos posteriormente.

Finalmente, 36 probandos preencheram critérios de inclusão, além de 13 familiares. Entre esses probandos, quatro foram excluídos após realização de painel genético que não demonstrou mutação germinativa num dos genes de reparo. Nenhum dos pacientes excluídos preenchia critérios de Amsterdam. Esses pacientes incluíam: 1) uma paciente com diagnóstico de adenocarcinoma de

sigmoide aos 47 anos de idade, com IHQ demonstrando perda de PMS2, que realizou painel genético para câncer colorretal incluindo 17 genes e validado para análise de variação de número de cópias, cujo resultado foi negativo; 2) uma paciente diagnosticada com adenocarcinoma de ceco aos 44 anos de idade, com IHQ normal mas demonstrando MSI-*high* na pesquisa molecular, que realizou painel genético incluindo 20 genes, não validado para CNV, com resultado negativo; 3) uma paciente diagnosticada com adenocarcinoma de cólon transversal aos 57 anos de idade, com IHQ demonstrando perda de MLH1 e PMS2, que realizou painel genético incluindo 20 genes, não validado para CNV, com resultado negativo; 4) um paciente diagnosticado com tumores sincrônicos de reto e cólon aos 80 anos de idade, que realizou painel genético incluindo 20 genes, não validado para CNV, com resultado demonstrando uma variante de significado incerto no gene *BRIP1*.

Figura 2 – PROCESSO DE EXCLUSÃO/INCLUSÃO DOS PROBANDOS



FONTE: A autora (2020).

Foram então incluídos 32 probandos entre 18 e 71 anos de idade, sendo que:

- 12 foram incluídos pelo critério de imunohistoquímica compatível com perda de MSH2, MSH6 ou PMS2, independente da história familiar;
- 10 foram incluídos pelo critério de teste genético demonstrando mutação germinativa num dos genes de reparo;
- 8 foram incluídos por preencherem critérios de Amsterdam I/II e

apresentarem IHQ compatível com ausência de qualquer uma das proteínas de reparo e; d) 2 foram incluídos pelo critério de IHQ demonstrando perda de MLH1 e características sugestivas de hereditariedade (representadas pelos critérios de Bethesda modificados). As principais características demográficas e clínicas dos 32 probandos incluídos estão apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2 – CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DOS PROBANDOS (continua)

	n=32	p-valor
Sexo, n (%)		
Feminino	18 (56,3%)	0.38
Masculino	14 (43,7%)	
Idade média ao dx, anos (DP)	41,3 (±12,4)	na
Grau de escolaridade, n (%)		
EF incompleto	5 (15,6%)	0.22
EF completo	7 (21,9%)	
EM incompleto	4 (12,5%)	
EM completo	14 (43,8%)	
ES completo	2 (6,2%)	
Sítio do tumor índice, n (%)		
Colorretal	21 (65,6%)	<0.001
Mama	3 (9,4%)	
Estômago	2 (6,3%)	
Pelve renal	2 (6,3%)	
Endométrio	1 (3,1%)	
Ovário	1 (3,1%)	
Testículo	1 (3,1%)	
Lipossarcoma	1 (3,1%)	
Critérios clínicos preenchidos, n (%)		
Amsterdam I	6 (18,7%)	0.24
Amsterdam II	7 (21,8%)	
Apenas Bethesda (sem AC)	11 (34,4%)	
HBOC	2 (6,3%)	
Nenhum	4 (12,5%)	
Hx familiar não disponível	2 (6,3%)	
EC do tumor índice, n (%)		
I	2 (6,3%)	0.22
II	14 (43,7%)	
III	8 (25%)	
IV	4 (12,5%)	
Não consta	4 (12,5%)	
Nº total de tumores diagnosticados, n (%)		
1	17 (53,1%)	<0.001
2	8 (25%)	
3	5 (15,7%)	
4	1 (3,1%)	
5	1 (3,1%)	

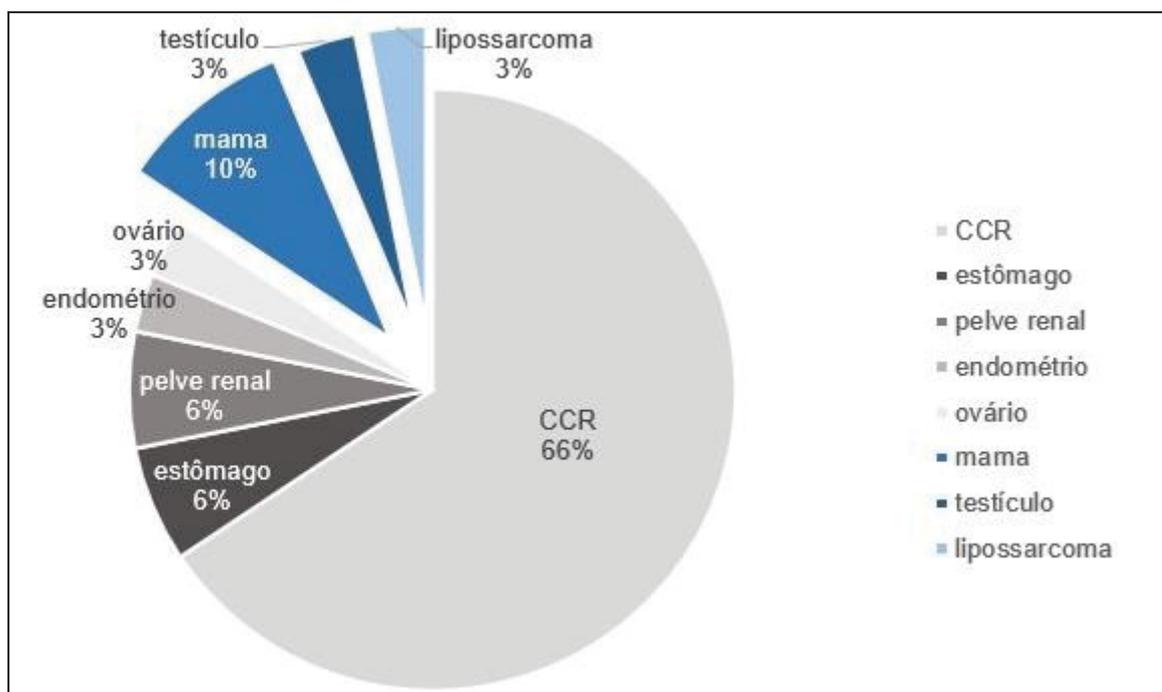
FONTE: A autora (2020).

(conclusão)

LEGENDA: DP: desvio padrão. Dx: diagnóstico. Na: não se aplica. EF: ensino fundamental. EM: ensino médio. ES: ensino superior. AC: critérios de Amsterdam. HBOC: síndrome de câncer de mama e ovário hereditários. Hx: história. EC: estágio clínico.

Até o momento da revisão dos prontuários, haviam sido diagnosticados 57 tumores nesses 32 pacientes, variando entre 1 e 5 tumores por paciente (Tabela 2). Vinte e quatro (75%) dos probandos tiveram seu primeiro tumor diagnosticado antes dos 50 anos de idade. De acordo com o esperado, em 84,4% dos casos (n=27) os tumores índice estavam em sítios do espectro da síndrome de Lynch. Cinco probandos apresentaram tumores que não são clássicos do espectro da síndrome, incluindo três tumores de mama, um de testículo e um lipossarcoma. A Figura 3 apresenta a distribuição proporcional dos sítios dos tumores índices dos probandos, com os tumores do espectro da síndrome apresentados em escala de cinza, e os tumores atípicos em escala de azul.

Figura 3 – DISTRIBUIÇÃO DOS TUMORES ÍNDICE ENTRE OS PROBANDOS



FONTE: A autora (2020).

Nas pacientes com câncer de mama, todas apresentaram carcinoma ductal invasor, mas a classificação imunoistoquímica do tumor foi heterogênea entre os três casos, sendo: um tumor com receptores hormonais positivos e sem HER2 superexpresso; um tumor com receptores hormonais positivos e com HER2

superexpresso; e um tumor com receptores hormonais negativos e HER2 superexpresso. Em três desses cinco casos de tumores atípicos, os pacientes não preenchiam nenhum critério clínico para síndrome de Lynch – em um dos casos, o diagnóstico clinicamente mais provável seria síndrome de Li-Fraumeni (lipossarcoma diagnosticado aos 18 anos); nos outros dois, havia critério para pesquisa de mutação de *BRCA1/BRCA2* (câncer de mama antes dos 45 anos de idade). Avaliando detalhadamente a história familiar dessas três pacientes, observamos que: no caso da paciente com lipossarcoma (probanda P30, Quadro 4), a sua história familiar materna não contava com muitos elementos comprobatórios (dúvida sobre se o avô teria tido CCR; um tio faleceu aos 50 anos por neoplasia, mas não sabiam informar o sítio), mas um primo de primeiro grau era paciente do hospital e foi possível checar que ele foi diagnosticado com um tumor de reto aos 27 anos. Para a probanda P31 (Quadro 4), com tumor primário em mama, uma irmã havia falecido aos 40 anos por um tumor gástrico diagnosticado aos 36, e a avó materna faleceu aos 50 anos por um câncer de bexiga – esses tumores, principalmente o de estômago, pertencem ao espectro da síndrome, mas a distribuição dos casos na família não permite preencher critérios, nem levanta fortemente uma suspeita diagnóstica para a SL. No caso da probanda P4 (Quadro 4), primário também em mama, não havia, em nenhum dos lados da família, parentes acometidos por tumores do espectro da SL (avós maternos com tumores de próstata e fígado; tia-avó paterna com tumor de mama e uma tia paterna, que também é paciente do hospital, diagnosticada com melanoma aos 38 anos). Logo, o diagnóstico de síndrome de Lynch nesses casos só foi possível devido à realização de painel multigene em detrimento de pesquisa molecular gene-a-gene.

No total, 15 pacientes apresentaram mais de um tumor, sendo que 11 apresentaram apenas tumores metacrônicos e 4 apresentaram tumores metacrônicos e também sincrônicos. Não houve diferença entre a idade média dos 17 probandos que tiveram apenas um tumor e a dos 15 que tiveram tumores sincrônicos e/ou metacrônicos (40,3 anos x 42,5 anos, respectivamente; teste *t* de Student, $p=0.60$). Para os 15 pacientes com tumores metacrônicos, a mediana do tempo entre o diagnóstico do tumor índice e do primeiro metacrônico foi de 107 meses (IIQ=132). Os quatro casos de tumores sincrônicos são representados por: 1) um paciente submetido a colectomia segmentar aos 46 anos de idade, cujo exame anatomopatológico demonstrou a presença de duas lesões sincrônicas na peça, que

posteriormente foi submetido a colectomia total aos 59 anos após o diagnóstico de um terceiro tumor, no ceco, e ainda apresentou um carcinoma sebáceo, ressecado aos 65 anos (probando P9, Quadro 4); 2) uma paciente que foi diagnosticada com um carcinoma ductal de mama aos 43 anos e um tumor sincrônico de cólon ascendente alguns meses após, além de um carcinoma urotelial de ureter aos 52 anos e um de bexiga aos 54 (P10, Quadro 4); 3) um paciente cujo tumor índice foi um carcinoma urotelial de pelve renal aos 71 anos, que posteriormente foi diagnosticado com adenocarcinomas de estômago e cólon sigmoide sincrônicos aos 74 anos (P15, Quadro 4); e 4) uma paciente cujo tumor índice foi um adenocarcinoma de cólon ascendente aos 34 anos, que foi posteriormente diagnosticada com um adenocarcinoma de cólon sigmoide aos 51 anos e um sincrônico de cólon transverso aos 52 anos (P28, Quadro 4). O Quadro 4 correlaciona os parâmetros clínicos e moleculares dos pacientes incluídos.

Quadro 4 – PRINCIPAIS PARÂMETROS CLÍNICOS E MOLECULARES DOS PROBANDOS

(continua)

ID prob.	Sítio do tumor índice	Idade ao dx	Sexo	AC	Crítérios de Bethesda	Tumores sinc. ou metac.	Proteína perdida na IHQ	Pesquisa molecular MSI	Teste genético
P1	cólon sigmoide	41	F	AC II	sim	não	MSH2 MSH6	NR	NR
P2	ovário	56	F	não	sim	cólon transverso	PMS2	NR	NR
P3	pelve renal	63	F	AC II	sim	endométrio	MLH1 MSH2 MSH6	NR	<i>MSH2:</i> c.2152C>T (p.Gln718*)
P4	mama	35	F	não	não	não	NR	NR	<i>MSH6:</i> c.2931C>A (p.Tyr977*)
P5	JRS	29	M	AC II	sim	não	MSH2 MSH6	NR	<i>MSH2:</i> c.2152C>T (p.Gln718*)
P6	reto	30	M	não	sim	não	PMS2	NR	NR
P7	ceco	61	F	AC II	sim	não	MLH1 PMS2	NR	NR
P8	cólon transverso	40	F	AC II	sim	não	MLH1 PMS2	NR	NR
P9	cólon NE (sincrônicos)	46	M	AC I	sim	ceco, carcinoma sebáceo	MLH1 MSH2 MSH6	NR	<i>MSH2:</i> c.2152C>T (p.Gln718*)
P10	mama	43	F	AC I	sim	ascendente (sinc. com a mama), ureter, bexiga	NR	NR	<i>MSH2:</i> c.2152C>T (p.Gln718*)
P11	cólon ascendente	39	F	adotada	sim	mama	NR	NR	<i>MLH1:</i> c.2065C>T (p.Gln689*)

Quadro 4 – PRINCIPAIS PARÂMETROS CLÍNICOS E MOLECULARES DOS PROBANDOS

(conclusão)

P12	cólon descendente	32	M	não	sim	não	PMS2	NR	NR
P13	ângulo hepático	46	M	não	sim	não	MLH1 PMS2	NR	NR
P14	reto	55	F	não	não	não	MSH6	NR	NR
P15	pelve renal	71	M	não consta	sim	cólon sigmoide e estômago sincrônicos	MSH2 MSH6	NR	NR
P16	cólon ascendente	25	M	não	sim	não	MSH6	NR	NR
P17	estômago	52	F	não	sim	não	PMS2	NR	NR
P18	ceco	34	M	não	sim	não	PMS2	NR	NR
P19	cólon NE	40	M	AC I	sim	cólon NE, ampola duodenal	MSH2 MSH6	NR	NR
P20	testículo	31	M	AC I	sim	reto, cólon ascendente	MSH2 MSH6	NR	<i>MSH2:</i> c.2271C>G (p.Tyr757*)
P21	endométrio	48	F	AC II	sim	não	PMS2	NR	NR
P22	reto	32	F	não	sim	não	MSH2 MSH6	NR	NR
P23	reto	29	M	não	sim	não	PMS2	NR	NR
P24	cólon sigmoide	44	F	AC II	sim	cólon ascendente	MSH2	NR	NR
P25	ceco	54	F	não	sim	não	MLH1 PMS2	NR	<i>MLH1:</i> c.676C>T (p.Arg226*)
P26	estômago	56	F	não	sim	cólon ascendente	MLH1 PMS2	NR	NR
P27	cólon transverso	24	M	não	sim	reto	MSH2	NR	NR
P28	cólon ascendente	34	F	AC I	sim	sigmoide e transverso sincrônicos	MLH1 PMS2	NR	NR
P29	cólon NE	33	M	adotado	sim	cólon transverso, ureter, cólon sigmoide e próstata	MSH2 MSH6	NR	NR
P30	lipossarcoma	18	F	não	não	osteossarcoma	MSH2 MSH6	NR	<i>MSH2:</i> c.2152C>T (p.Gln718*)
P31	mama	42	F	não	não	não	NR	NR	<i>MSH6:</i> c.1723_1724insT (p.Asp575Valfs*1)
P32	reto	40	M	AC I	sim	cólon ascendente	MSH6	NR	NR

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: M: masculino. F: feminino. Prob.: probando. JRS: junção retossigmoide. Cólon NE: não especificada localização do tumor no cólon. Dx: diagnóstico. AC: critérios de Amsterdam. Sinc.: sincrônicos. Metac.: metacrônicos. NR: não realizado.

Todos os 15 pacientes que tiveram mais de um tumor preenchiam algum critério para suspeição de hereditariedade já ao diagnóstico do tumor índice, que poderia ter justificado encaminhamento para avaliação pela Oncogenética, sendo: 7 famílias que preenchiam critérios de Amsterdam; 7 pacientes que preenchiam pelo menos um dos critérios revisados de Bethesda; 1 paciente que não preenchia nenhum desses critérios, mas teve seu tumor índice (lipossarcoma) diagnosticado aos 18 anos. No entanto, dois desses pacientes tiveram todos os diagnósticos antes da criação do serviço de Oncogenética e oito foram encaminhados após já terem tido todos os seus tumores diagnosticados. Entre os cinco pacientes restantes: dois tiveram novos tumores após já terem sido avaliados pela Oncogenética (sendo um osteossarcoma, para o qual não estava previsto rastreamento, e um tumor de cólon ascendente diagnosticado 6 meses após início do acompanhamento); dois tiveram lesões colônicas pré-malignas avançadas diagnosticadas em colonoscopias de seguimento; e uma paciente se queixou de hematúria no dia que recebeu o resultado do seu teste genético confirmando síndrome de Lynch, sendo então submetida a tomografia de abdome e pelve que detectou uma lesão vesical. Doze dos 15 (80%) segundos tumores diagnosticados eram tumores colorretais, ou seja, tumores com grande potencial de prevenção.

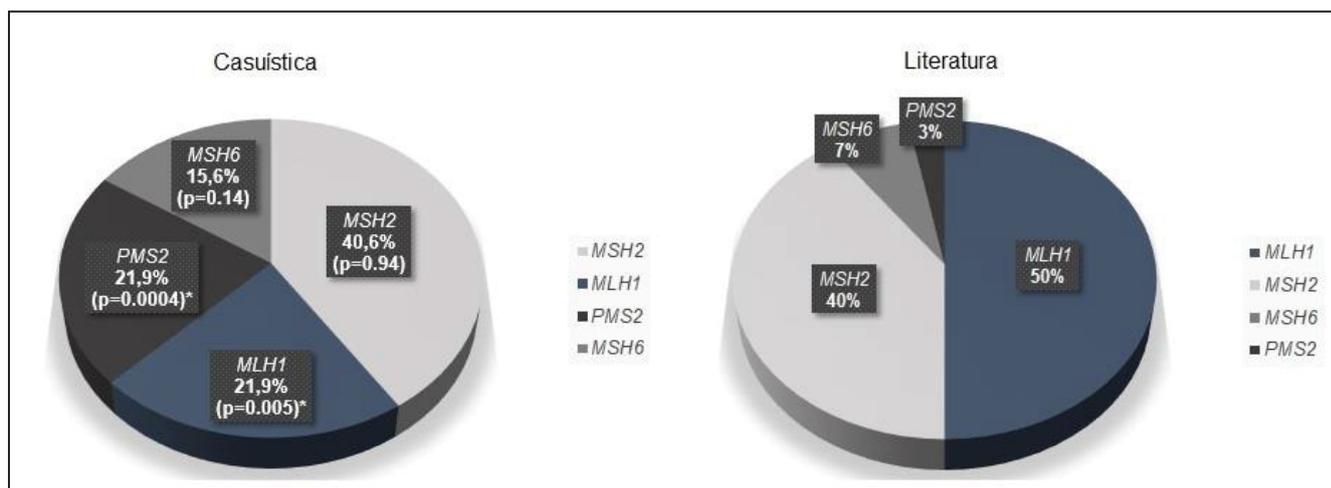
Ao todo, considerando tanto os tumores índice quanto os sincrônicos e metacrônicos, foram diagnosticados 37 tumores colorretais em 26 dos 32 probandos, sendo 21 tumores índice e 16 sincrônicos/metacrônicos. Dezoito probandos apresentaram apenas um tumor colorretal durante seu seguimento; cinco probandos apresentaram dois CCR (P19, P20, P24, P27 e P32, Quadro 4); e três probando apresentaram três CCR (P9, P28 e P29). Para cinco desses tumores, não consta informação sobre localização e dados anatomopatológicos do tumor. Dos 32 tumores restantes, 18 (56,2%) ocorreram em localização proximal e 14 foram distais ao ângulo esplênico ($p=0.62$), sendo 7 tumores de reto. Nove (28,1%) apresentam descrição de componente mucinoso ou presença de células em anel de sinete. Apenas 2 dos 36 tumores colorretais se apresentaram em estágio clínico IV; um desses pacientes foi à óbito e o outro permanece vivo e livre de doença metastática após quase 20 anos da ressecção da metástase hepática.

Em relação à história familiar de câncer, 2 dos pacientes incluídos foram adotados e não conheciam a história da sua família de origem; das 30 famílias restantes, apenas 43,3% ($n=13$) preenchiam critérios de Amsterdam I ou II, sendo

que apenas 6 preenchiam critérios de Amsterdam I (20%). Em relação aos critérios revisados de Bethesda, 87,5% (n=28) dos probandos preenchiam pelo menos um dos cinco critérios. É interessante notar que duas famílias (6,7%) preenchiam critérios para investigação de síndrome de câncer de mama e ovário hereditários.

Os casos de todos os 32 probandos foram atribuídos a um dos genes de reparo como gene causal, mesmo os dos que não realizaram teste genético – nesses casos, o gene responsável foi inferido pelo resultado da IHQ. Sendo assim, o gene *MSH2* foi o responsável pela maioria dos casos – 40,6% (n=13). Já *MLH1* foi identificado como responsável em 21,9% dos casos (n=7), na mesma proporção que *PMS2*. Essa maior quantidade de casos atribuídos a *PMS2* está em forte discordância com a literatura (p=0.004), conforme será discutido adiante. Apenas cinco casos (15,6%) foram relacionados ao gene *MSH6*. A Figura 4 demonstra a proporção de casos atribuídos a cada gene na literatura, em comparação com a nossa casuística. Entre os pacientes que tiveram mutação germinativa detectada no teste genético, chama a atenção a identificação de uma mesma mutação de *MSH2*:c.2152C>T (p.Gln718*) em cinco probandos não relacionados.

Figura 4 – PROPORÇÃO DE CASOS ATRIBUÍDOS A CADA UM DOS GENES DE REPARO



FONTE: KOHLMANN; GRUBER (2004); a autora (2020).

Conforme os critérios utilizados para a inclusão de cada probando, citados previamente e demonstrados no Quadro 4, nesse grupo de 32 pacientes altamente selecionados como suspeitos para síndrome de Lynch, apenas 10 (31,2%) tiveram acesso à confirmação diagnóstica molecular, cujo resultado é de suma importância para a definição de condutas tanto para o probando quanto para os familiares.

Em relação aos testes genéticos realizados pelos pacientes citados nesse estudo, não houve uma uniformização dos laboratórios utilizados. Isso porque o SUS não oferece esses testes e a sua realização depende da disponibilidade financeira do paciente, caso apresente interesse após aconselhamento. Dentro desse cenário, os médicos assistentes do serviço de Oncogenética apresentam alguns dos testes comercialmente disponíveis, informando sobre número de genes testados, valores, logística de coleta e envio, técnicas e limitações. O paciente, então, faz a sua escolha informada. Entre os testes oferecidos pelos principais laboratórios utilizados no período, estão um painel multigene incluindo 17 genes relacionados a CCR, avaliados por NGS e com validação para análise de CNV; um painel de 20 genes relacionados às principais síndromes de câncer hereditário, avaliados por NGS; e um painel multigene incluindo 40 genes relacionados às principais síndromes de câncer hereditário avaliados por NGS.

Entre os dez probandos com mutação germinativa confirmada por teste genético, apenas cinco preenchem critérios de Amsterdam I/II (5/9 = 55,6% - um dos dez pacientes é adotado). Nove das mutações identificadas foram do tipo *nonsense* e uma do tipo *frameshift* por inserção de nucleotídeo único. Esses dez pacientes apresentaram seis mutações distintas, já que uma mutação se repetiu em cinco probandos não relacionados (*MSH2*:c.2152C>T). Entre os cinco probandos com essa mesma variante, quatro (80%) preenchem critérios de Amsterdam I/II. Essa mutação *nonsense* de *MSH2* consta no banco de dados ClinVar, já foi descrita em várias famílias com SL e é classificada como patogênica. Ela está localizada no éxon 13 e origina um códon de terminação prematuro na posição 718, resultando numa proteína truncada. As outras cinco mutações distintas incluíam: uma no gene *MLH1* que origina códon de terminação prematuro na posição 226, resultando em proteína truncada (presente no ClinVar – patogênica); uma no gene *MSH2* que resulta em códon de terminação na posição 757 – essa variante não consta no banco de dados ClinVar, mas é classificada como patogênica segundo os critérios do ACMG; uma no gene *MSH6* que origina códon de terminação prematuro na posição 977 (presente no ClinVar – patogênica); uma inserção de uma timina entre os nucleotídeos 1723 e 1724 no gene *MSH6*, que não consta no ClinVar, mas é classificada como patogênica pelos critérios do ACMG; uma no gene *MLH1* que origina um códon de terminação no penúltimo éxon e deleta apenas os últimos 68 aminoácidos, mas afeta um domínio carboxi-terminal altamente conservado,

responsável pela dimerização com PMS2 – por isso, é classificada como patogênica no ClinVar.

Uma particularidade sobre a história familiar de um dos pacientes com a mutação *MSH2:c.2152C>T* chama atenção: a probanda P10 relata um possível casamento consanguíneo no lado materno da família (que parece ser o afetado); dessa união teriam nascido duas crianças que faleceram por tumor já na primeira década de vida. Infelizmente, os pais desses indivíduos não atenderam a solicitação de comparecer para aconselhamento genético. O relato de consanguinidade e acometimento por tumores já na primeira infância, no contexto de uma família diagnosticada com SL levanta a hipótese de deficiência constitucional de proteínas de reparo (citada no item 2.2.8), uma condição muitíssimo rara e, portanto, de grande interesse para estudo.

No total, oito pacientes apresentaram perda da proteína PMS2 na IHQ, mas apenas um teve acesso a teste genético, que não detectou mutação germinativa no gene correspondente. O gene *PMS2* é teoricamente o menos frequentemente envolvido na SL, e o teste genético seria de bastante valia para esclarecer o excesso desses casos na nossa população. Conforme discutido no tópico 2.2.2, a pesquisa molecular de variantes no gene *PMS2* apresenta vários desafios e nem todos os laboratórios comercialmente disponíveis abrangem essas questões.

Seis dos dez pacientes que tiveram mutação germinativa identificada no teste genético haviam tido seus tumores submetidos à imunoistoquímica, sendo que em quatro casos o padrão de perda de proteínas foi compatível com o achado molecular. Em dois casos, pacientes com mutação germinativa identificada no gene *MSH2* apresentaram IHQ com perda de MLH1/*MSH2*/*MSH6* – a perda de MLH1 nesse contexto não é um achado esperado. Além desses 2 casos, 15 outros pacientes apresentaram IHQ com padrões de perda de proteínas incongruentes em relação à combinação conhecida das proteínas em heterodímeros. Cinco desses 15 casos eram de pacientes já em óbito e, portanto, não foi realizada nenhuma avaliação adicional. Os demais foram submetidos a revisão de lâmina ou investigação molecular adicional para elucidação; os desfechos pós-revisão estão demonstrados no Quadro 5 (pacientes identificados pela sigla IR – imunoistoquímica revisada). Em dois casos, os pacientes puderam realizar teste genético, sendo que em um caso foi encontrada uma mutação patogênica do gene *MUTYH:c.1187G>A* (p.Gly396Asp) em heterozigose (IR 7) e no outro, um painel de sequenciamento

avaliando 40 genes teve resultado normal (IR 10). Essa última paciente também realizou pesquisa molecular de instabilidade de microssatélites, que revelou tumor estável. Mais um dos pacientes teve sua investigação complementada com pesquisa molecular de MSI, que demonstrou tumor estável (IR 8). Nos sete casos restantes, as lâminas das imunistoquímicas prévias foram reavaliadas pelo serviço de Anatomia Patológica do Hospital Erasto Gaertner (HEG) que, após revisão de lâmina ou repetição das reações de IHQ, emitiu novos laudos.

Quadro 5 – DESCRIÇÃO DOS CASOS DE EXAMES DE IMUNOISTOQUÍMICA COM RESULTADOS INICIALMENTE INCONGRUENTES (continua)

ID IHQ rev. (IR)	Sítio do tumor	IHQ inicial	Realizada nova reação?	Novo laudo IHQ	AC	critérios de Bethesda	Pesquisa molecular MSI	Teste genético	Desfecho
IR1	cólon transverso	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2-	sim	PMS2-	não	sim	NR	NR	incluído (ID P2)
IR2	reto	MLH1- MSH6-	sim	normal	não	sim	NR	NR	excluído
IR3	reto	MSH6- PMS2-	sim	normal	não	sim	NR	NR	excluído
IR4	reto	MLH1- MSH6-	sim	normal	não	não	NR	NR	excluído
IR5	cólon transverso	“positivo fraco” para todos os marcadores	não	normal	não	não	NR	NR	excluído
IR6	reto	MLH1- MSH2-	sim	normal	AC I	sim	NR	NR	excluído
IR7	sigmoide	MLH1- MSH6-	não	normal	não	sim	NR	<i>MUTYH</i> : c.1187G>A	excluído
IR8	CHC	MLH1- MSH2- MSH6- PMS2-	não	NR	não	não	MSS	NR	excluído
IR9	cólon ascendente	MSH6-	não	normal	não	sim	NR	NR	excluído
IR10	cólon sigmoide	MSH6- PMS2-	não	NR	não	sim	MSS	painel multigene 40 genes normal	excluído
IR11	ângulo hepático	MLH1- MSH6-	não (óbito)	NR	não	sim	NR	NR	excluído
IR12	pâncreas	MSH6- PMS2-	não (óbito)	NR	AC II	sim	NR	NR	excluído
IR13	cólon descendente	MSH6 PMS2-	não (óbito)	NR	AC I	sim	NR	NR	excluído
IR14	cólon ascendente	MLH1- MSH2- MSH6 PMS2-	não (óbito)	NR	AC II	sim	NR	NR	excluído
IR15	endométrio	MLH1- MSH2-	não (óbito)	NR	não	sim	NR	NR	excluído

(conclusão)

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Rev.: revisada. AC: critérios de Amsterdam. CHC: carcinoma hepatocelular. MSS: estabilidade de microssatélites. NR: não realizado. NGS: *next-generation sequencing*.

Onze pacientes realizaram painel multigene que detectou VUS num dos genes de reparo (Quadro 6). Em apenas um desses casos, a família preenchia critérios de Amsterdam. Nenhum dos casos em que a IHQ foi realizada demonstrou perda de proteínas de reparo. Em um dos casos (ID VUS8), não consta descrição da troca de nucleotídeos identificada no gene *PMS2* no prontuário eletrônico. Um dos pacientes (ID VUS2) apresentou, além de uma VUS em *MSH6*, uma variante com interpretações conflitantes de patogenicidade (VUS ou provavelmente patogênica) em heterozigose no gene *MUTYH*; a história familiar apresentava dois casos de câncer, sendo melanoma em um irmão e um tumor de sistema nervoso central na mãe. Em outro caso (ID VUS11) de paciente sem câncer, mas com história familiar de filha com tumor adrenal virilizante na infância e pai com tumor de reto, o painel multigene demonstrou uma VUS em *MSH6* e uma variante provavelmente patogênica em *BARD1*. O gene *BARD1* está associado com aumento de risco para câncer de mama, mas não para os tumores relatados nessa família.

Quadro 6 – DESCRIÇÃO DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO DETECTADAS (continua)

ID VUS	Sítio do tumor	Idade ao dx	Sexo	critérios de Amsterdam	critérios de Bethesda	IHQ inicial	Pesquisa molecular MSI	Teste genético
VUS1	adenoma TV com DAG - sigmoide	40	M	não	não	normal	NR	<i>MSH6</i> :c.3019T>C (p.Trp1007Arg)
VUS2	ângulo hepático	60	F	não	sim	normal	NR	<i>MSH2</i> :c.80C>T (p.Pro27Leu) <i>MUTYH</i> :c.736G>T (p.Val246Phe)
VUS3	adenoma TV com DAG - ceco	52	M	AC II	sim	normal	NR	<i>MSH6</i> :c.663A>C (p.Glu221Asp)
VUS4	história familiar de câncer de mama	42	F	não	não	NR - sem câncer	NR - sem câncer	<i>MSH2</i> :c.2308A>G (p.Ile770Val)
VUS5	mama	30	F	não	não	NR	NR	<i>MSH6</i> :c.663A>C (p.Glu221Asp)
VUS6	mama	39	F	não	não	normal	NR	<i>MSH6</i> :c.884A>G (p.Lys295Arg)
VUS7	mama	47	F	não	não	NR	NR	<i>MSH6</i> :c.-118G>A
VUS8	mama	25	F	não	não	NR	NR	VUS <i>PMS2</i>

Quadro 6 – DESCRIÇÃO DAS VARIANTES DE SIGNIFICADO INCERTO DETECTADAS (conclusão)

VUS9	ovário	45	F	não	não	normal	NR	<i>MSH2</i> : c.2785C>T (p.Arg929*)
VUS10	pâncreas	16	M	não	não	NR	NR	<i>MSH6</i> :c.3019T>C (p.Trp1007Arg)
VUS11	história familiar de câncer de adrenal e reto	35	F	não	não	NR - sem câncer	NR - sem câncer	<i>MSH6</i> :c.334A>G (p.Asn112Asp) <i>BARD1</i> :c.176_177delAG (p.Glu59Alafs)

FONTE: A autora (2020).

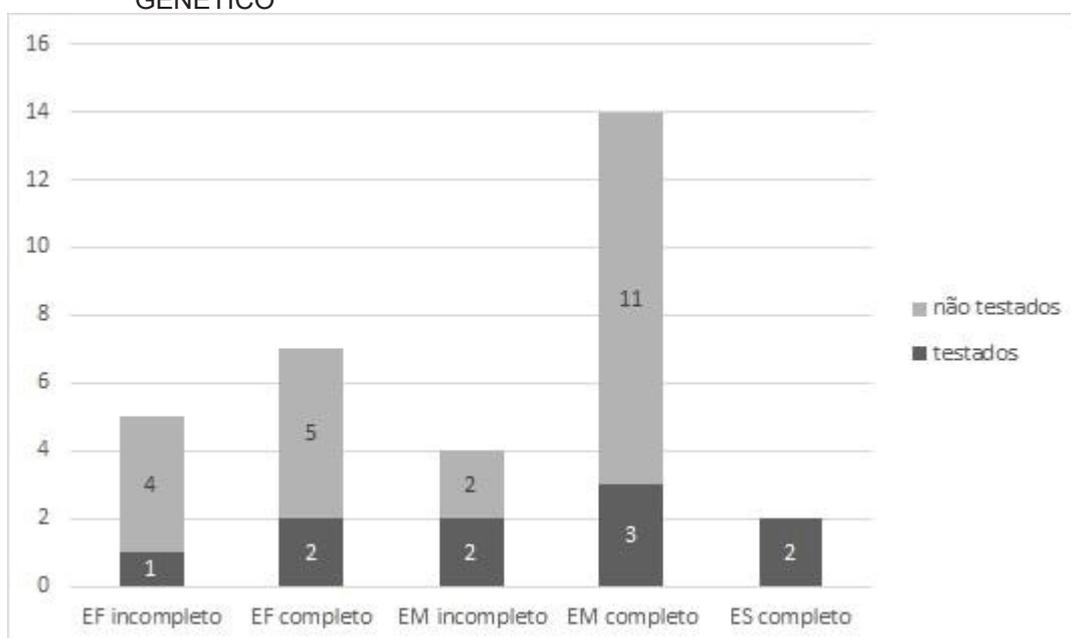
LEGENDA: M: masculino. F: feminino. TV: túbulo-viloso. DAG: displasia de alto grau. Dx: diagnóstico. AC: critérios de Amsterdam. NR: não realizada.

A possibilidade de acompanhamento dos familiares pelo serviço de Oncogenética é oferecida em todos os casos em que a história familiar seja considerada um fator de alto risco, independente da realização ou não de teste genético pelo probando. Em especial, todos os probandos que receberam confirmação molecular do diagnóstico de SL foram orientados sobre a importância de informar os resultados aos seus familiares em risco e de se manter o seguimento de todos os portadores conforme protocolo, mesmo se assintomáticos (vide tópico 2.2.8). O agendamento de aconselhamento genético pré-teste para todos os familiares interessados é oferecido de rotina pelo serviço. Porém, ao todo, apenas 22 familiares de 6 probandos estão em acompanhamento no serviço, sendo que apenas 3 probandos com teste genético positivo trouxeram familiares para aconselhamento e teste em cascata.

Em dois casos de pacientes com diagnóstico molecular confirmado, consta em prontuário que os pacientes relataram, na sua primeira consulta de retorno após o diagnóstico molecular, que informaram seus familiares e que esses responderam não ter interesse em dar continuidade à investigação. Uma justificativa comum para esse fato, trazida não só pelos pacientes com SL, mas também por pacientes com outras síndromes de predisposição a câncer, é que muitas vezes os familiares saudáveis não acreditam que seja interessante ou benéfico procurar um médico quando estão assintomáticos. Alguns pacientes relatam inclusive serem acusados de “procurar problemas” ou “serem muito pessimistas/negativos” quando apresentam o seu diagnóstico e a indicação de seguir a investigação para a família. Em três casos, os probandos relataram que os familiares estariam se organizando financeiramente para realizar a pesquisa da mutação familiar. Por fim, conforme citado acima, entre os dez pacientes com teste genético positivo, apenas três

(probandos P3, P5 e P9) trouxeram familiares para pesquisa da mutação pontual. É interessante notar que os dois únicos probandos que concluíram o Ensino Superior (P5 e P9) estão entre esses três pacientes que realizaram teste genético e deram algum prosseguimento à investigação familiar. O gráfico da Figura 5 mostra a frequência de realização de teste genético segundo o nível de escolaridade de cada probando. Não houve diferença estatística na proporção de pacientes com ou sem o Ensino Superior (ES) completo que realizaram teste genético ($p=0.09$), porém o número extremamente pequeno de pacientes que completaram o ES pode ter comprometido os resultados.

Figura 5 – NÍVEL DE ESCOLARIDADE DOS PROBANDOS VS. REALIZAÇÃO DE TESTE GENÉTICO

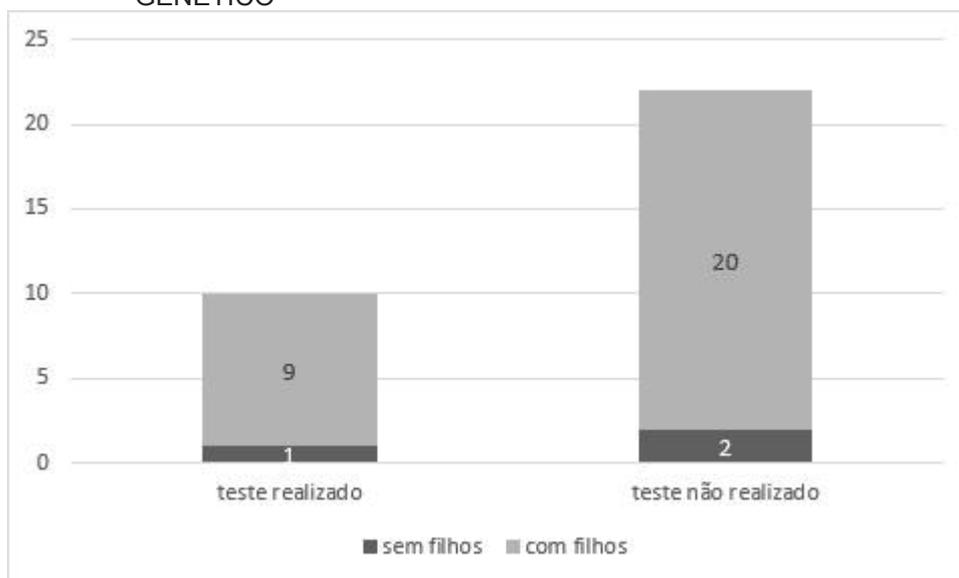


FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: EF: ensino fundamental. EM: ensino médio. ES: ensino superior.

Outro fator que costuma ser observado na prática clínica como uma justificativa para o não interesse pelo diagnóstico molecular é a ausência de prole. Buscando investigar esse fator, a Figura 6 correlaciona a proporção de probandos com e sem filhos que realizaram ou não teste genético. Também não houve nenhuma diferença entre a proporção de pacientes com ou sem filhos que realizou teste genético ($p=1.00$). Mais uma vez, o número baixo de probandos sem filhos dificulta a análise.

Figura 6 – RELAÇÃO DA PRESENÇA DE PROLE COM REALIZAÇÃO OU NÃO DE TESTE GENÉTICO



FONTE: A autora (2020).

Em relação aos pacientes que trouxeram familiares para teste em cascata, a probanda P3 tem quatro filhos, dos quais dois compareceram para aconselhamento. A pesquisa da mutação pontual foi negativa para a filha, que recebeu alta; o teste do filho foi positivo, mas ele não retornou para manter acompanhamento no hospital. O probando P5 trouxe o irmão, além de vários tios e primos maternos para aconselhamento, e tem hoje 12 familiares positivos em acompanhamento, além de pelo menos 3 familiares negativos que receberam alta (vide heredograma no Apêndice 1). Entre esses 12 familiares em acompanhamento, 1 teve diagnóstico de câncer – uma tia materna com carcinoma pouco diferenciado de colo uterino e vulva, com metástase óssea que levou à necessidade de amputação do membro inferior direito para tratamento. Os diagnósticos dessa paciente ocorreram antes da identificação da mutação na família. Após o diagnóstico molecular, dois dos familiares apresentaram lesões polipoides avançadas no seguimento colonoscópico, sendo que um realizou ressecção endoscópica e no outro caso foi necessária retossigmoidectomia, por se tratar de lesão irressecável endoscopicamente. O estudo anatomopatológico de ambas as lesões revelou adenoma túbulo-viloso com displasia de alto grau. Já o probando P9 trouxe os seus cinco filhos para aconselhamento e pesquisa da mutação familiar, dos quais três não apresentaram a mutação e dois foram positivos. Os dois filhos possuem seguros de saúde/convênios médicos e optaram por não fazer o acompanhamento no nosso serviço.

Os demais dez familiares em acompanhamento são relacionados a quatro probandos que não tem teste genético realizado. Esses quatro probandos estão sendo seguidos como SL por apresentarem tumores com perda de proteínas de reparo na IHQ e, seguindo as orientações da NCCN, seus familiares não testados estão sendo seguidos de maneira personalizada de acordo com a história familiar.

O Quadro 7 traz o espectro tumoral observado nos familiares de cada um dos probandos, segundo gênero e idade, com anotação sobre os critérios clínicos preenchidos por cada família. Os heredogramas disponíveis estão apresentados no Apêndice 1.

Quadro 7 – ESPECTRO TUMORAL NA FAMÍLIA DOS PROBANDOS

(continua)

ID	Critério de inclusão	Tumores nos probandos (gênero, idade dx)	Tumores em parentes de 1º grau (gênero, idade dx)	Tumores em parentes de 2º grau (gênero, idade dx)	Tumores em parentes de 3º grau (gênero, idade dx)	Critérios clínicos
P1	AC II + IHQ (MSH2-/MSH6-)	CCR (F,41)	SNC (M,48), estômago (F,48)	CCR (M,65), estômago (F,60)	próstata (M,42), CCR (F,45)	AC II
P2	IHQ (PMS2-)	ovário; CCR (F,55; 66)	pulmão (M,67), SNC (M,60), C/P (M,60)	0	0	não
P3	Teste genético <i>MSH2</i> : c.2152C>T	pelve renal; endométrio (F,63; 65)	endométrio (F,43), CCR (M,64), VB (F,69)	SPNI (M,nc)	0	AC II
P4	Teste genético <i>MSH6</i> : c.2931C>A	mama (F,35)	0	melanoma (F,38)	mama (F,45)	HBOC
P5	Teste genético <i>MSH2</i> : c.2152C>T	CCR (M,29)	mama; CCR (F,52; 54)	rim (F,48), útero (F,44), CCR (M,52), CCR; esôfago (M, 41/70)	0	AC II
P6	IHQ (PMS2-)	CCR (M,30)	0	próstata (M,67)	estômago (M,45)	Bethesda
P7	AC II + IHQ (MLH1-)	CCR (F,61)	estômago (F,47), SNC (M,42), CCR (M,60s), CCR (M,82)	C/P (M,70)	0	AC II
P8	AC II + IHQ (MLH1-)	CCR (F,40)	NSPO (F,69)	CCR (M,45)	delgado (F,25), abdominal (F,42)	AC II
P9	Teste genético <i>MSH2</i> : c.2152C>T	CCR sincrônicos; CCR metacrônico; carcinoma sebáceo (M,46; 59; 65)	CCR (M,45), TGF (F,53)	CCR (M,45)	ovário (F,55)	AC I
P10	Teste genético <i>MSH2</i> : c.2152C>T	mama; CCR; ureter (F,43; 44; 53)	CCR (M,31), CCR (F,40), ovário (F,40)	CCR (M,63)	estômago (M,60s), CCR (F,60), CCR (F,60), leucemia (F,45)	AC I
P11	Teste genético <i>MLH1</i> : c.2065C>T	CCR; mama (F,39; 48)	na	na	na	adotada

Quadro 7 – ESPECTRO TUMORAL NA FAMÍLIA DOS PROBANDOS

(continuação)

P12	IHQ (PMS2-)	CCR (M,32)	0	0	0	Bethesda
P13	Bethesda + IHQ (MLH1-/PMS2-)	CCR (M,45)	próstata (M,50)	SNC (F,62), CCR (F,73), pulmão (M,58), C/P (M,50s), SPNI (M,60s), SPNI (M,68)	0	Bethesda
P14	IHQ (MSH6-)	CCR (F,55)	0	leucemia (M,29), fígado (M,61), mama; CCR (F,68; 71)	CCR (M,28)	não
P15	IHQ (MSH2-/MSH6-)	pelve renal; adenoma sebáceo CCR; estômago (M,71; 73; 74; 74)	nc	nc	nc	Bethesda
P16	IHQ (MSH6-)	CCR (M,25)	0	0	0	Bethesda
P17	IHQ (PMS2-)	estômago (F,52)	0	CCR (M,50s), pâncreas (F,60s)	CCR (M,50s), estômago (M,40s), SPNI (F,60s), SPNI (M,43)	Bethesda
P18	IHQ (PMS2-)	CCR (M,34)	CCR (M,45)	CCR (M,45), CCR (M,48), estômago (M,50s)	0	Bethesda
P19	AC I + IHQ (MSH2-/MSH6-)	CCR; CCR metacrônico; ampola duodenal (M,40; 47; 57)	CCR (M,nc), CCR (M,nc), CCR (M,nc), CCR (M,nc)	CCR (M,nc), CCR (M,nc), CCR (M,nc), CCR (M,nc)	nc	AC I
P20	Teste genético <i>MSH2</i> : c.2271C>G	testículo; CCR; CCR metacrônico (M,31; 45; 51)	disgerminoma ovário (F,26)	CCR; esôfago (M,37; 56), SNC (M,49)	CCR (M,50s), CCR (M,nc)	AC I
P21	AC II + IHQ (PMS2-)	ovário (F,48)	CCR (M,49)	endométrio (F,35), endométrio (F,60)	0	AC II
P22	IHQ (MSH2-/MSH6-)	CCR (F,32)	0	SPNI (F,nc), SPNI (F,nc)	0	Bethesda
P23	IHQ (PMS2-)	CCR (M,29)	0	0	0	Bethesda
P24	AC II + IHQ (MSH2-)	CCR, CCR metacrônico (F,44; 45)	CCR (F,50s)	bexiga; pulmão (F,52; 57)	0	AC II
P25	Teste genético <i>MLH1</i> : c.676C>T	CCR (F,54)	mama (F,72), pulmão (M,40)	estômago (F,50), colo uterino (F,30)	0	não
P26	Bethesda + IHQ (MLH1-/PMS2-)	estômago; CCR (F, 56; 69)	CCR (M,60), estômago (M,64), leucemia (M,70)	0	mama (F,nc)	Bethesda
P27	IHQ (MSH2-)	CCR; CCR metacrônico (M, 24; 42)	CCR (F,69)	0	0	Bethesda
P28	AC I + IHQ (MLH1-/PMS2-)	CCR; CCR metacrônico; CCR sincrônico (F,34; 51; 52)	CCR (M,39), CCR (M,50)	esôfago (M,nc)	0	AC I

Quadro 7 – ESPECTRO TUMORAL NA FAMÍLIA DOS PROBANDOS

(conclusão)

P29	IHQ (MSH2- /MSH6-)	CCR; CCR metacrônico; ureter; CCR metacrônico; próstata (M,33; 45; 52; 54; 58)	na	na	na	adotado
P30	Teste genético <i>MSH2: c.2152C>T</i>	lipossarcoma; osteossarcoma (F,18; 20)	0	SPNI (M,50), pele não melanoma (F,nc)	CCR (M,27)	não
P31	Teste genético <i>MSH6: c.1723 1724insT</i>	mama (F,42)	estômago (F,36)	bexiga (F,nc)	0	HBOC
P32	AC I + IHQ (MSH6-)	CCR; CCR metacrônico (M,40; 63)	CCR (F,45), CCR (M,72)	0	0	AC I

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Dx: diagnóstico. AC: critérios de Amsterdam. IHQ: imunoistoquímica. CCR: câncer colorretal. SNC: sistema nervoso central. C/P: cabeça e pescoço. VB: vesícula biliar. HBOC: síndrome de câncer de mama e ovário hereditários. SPNI: sítio primário não informado (probando não soube precisar o diagnóstico desse familiar). NSPO: neoplasia de sítio primário oculto (confirmado por registro médico). TGF: trato genital feminino. Na: não se aplica. Nc: não consta.

Somando-se todos os tumores do Quadro 7, tanto de probandos quanto de familiares, essas 32 famílias apresentaram 165 tumores acometendo 135 indivíduos, sendo 76 homens e 59 mulheres ($p=0.33$). Ao considerarmos a idade ao diagnóstico do primeiro tumor de cada um desses indivíduos (dado disponível para 119 dos 135 pacientes), a média foi de 48,6 ($\pm 13,1$) anos de idade ao primeiro diagnóstico, variando entre 18 e 82 anos. O número de indivíduos acometidos por família variou de um a nove. Na maioria dos casos (29 das 32 famílias) era possível inferir o lado da família acometido, mesmo sem realização de teste genético, sendo então contabilizados apenas os tumores desse lado. Nos casos em que não foi possível a inferência (P14, P18 e P31 – vide heredogramas no Apêndice 1), também foram contabilizados tumores de apenas um dos lados, visando manter a fidelidade dos dados e não superestimar o número de tumores. O espectro de tumores foi bastante amplo, com 23 diferentes sítios primários citados (excluindo-se os casos em que os probandos não souberam relatar com precisão o sítio envolvido). Dos 165 tumores observados, 81 (49%) foram colorretais – esse foi o sítio mais comum, com ampla vantagem. A média de idade ao diagnóstico dos CCR foi de 48,2 anos (± 13). Em segundo lugar, apareceram os tumores de estômago ($n=13$), idade média de 52,5 anos ($\pm 10,3$) ao diagnóstico; em terceiro, os tumores de mama ($n=9$), com idade média de 50,6 anos (± 13) ao diagnóstico. Na sequência, após esses três sítios

principais, os tumores mais frequentes nessa população foram os uroteliais (n=7), endométrio (n=5), ovário (n=5) e tumores do sistema nervoso central (n=5). Todos os outros sítios foram observados em frequência menor que cinco. Chama atenção o excesso relativo de casos de câncer de mama, já que esse sítio não faz parte do espectro da SL, assim como a relativa escassez de casos de câncer de endométrio – esses achados serão discutidos posteriormente.

A distribuição exata desses tumores nessas famílias pode ser vista também nos heredogramas do Apêndice 1. Todos os sítios primários presentes nessas famílias, com suas respectivas frequências e faixa de idade ao diagnóstico, estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3 – ESPECTRO TUMORAL NAS FAMÍLIAS COM SÍNDROME DE LYNCH ACOMPANHADAS NO HOSPITAL ERASTO GAERTNER

Tumores	n	Dx ≤50 anos (n)	Dx > 50 anos (n)	Idade nc
Total	165	83	66	16
Colorretal	81	46	26	9
Estômago	13	7	6	0
Mama	9	5	3	1
Urotelial	7	1	5	1
Endométrio	5	3	2	0
Ovário	5	3	2	0
SNC	5	3	2	0
Próstata	4	2	2	0
Pulmão	4	1	3	0
Leucemia	3	2	1	0
C/P	3	1	2	0
Intestino delgado	2	1	1	0
Esôfago	2	0	1	1
Sarcoma	2	2	0	0
Adenoma sebáceo	1	0	1	0
Carcinoma sebáceo	1	0	1	0
Testículo	1	1	0	0
Pâncreas	1	0	1	0
Fígado	1	0	1	0
Vesícula biliar	1	0	1	0
Melanoma	1	1	0	0
Pele não melanoma	1	0	0	1
Colo uterino	1	1	0	0
NSPO	1	0	1	0
SPNI	10	3	4	3

FONTE: A autora (2020).

LEGENDA: Dx: diagnóstico. Nc: não consta. SNC: sistema nervoso central. C/P: cabeça e pescoço. NSPO: neoplasia de sítio primário oculto (confirmada por registro médico). SPNI: sítio primário não informado (probando não soube precisar o diagnóstico desse familiar).

6 DISCUSSÃO

O presente estudo discute aspectos interessantes tanto do ponto de vista de achados clínicos e moleculares, quanto também dos desafios relacionados à prática clínica da Oncogenética no âmbito do sistema público de saúde. Em primeiro lugar, muito se fala sobre a questão do subdiagnóstico da síndrome de Lynch. Buscando quantificar esse dado num hospital que dispõe de um serviço de Oncogenética, solicitamos ao Serviço de Arquivo Médico e Estatística – Registro Hospitalar de Câncer (SAME – RHC) uma lista contendo registro e idade de todos os pacientes que deram entrada no HEG entre 2012 e 2018 com CID C18, C19 ou C20 (câncer de cólon, junção retossigmoide ou reto, respectivamente). Ao todo, foram registrados 2,023 mil casos. Estima-se que cerca de 2-7% de todos os casos de CCR sejam relacionados à síndrome de Lynch. Utilizando-se o valor arbitrário de 5%, seriam esperados cerca de 101 casos de SL no período. Considerando esse cenário, teriam sido diagnosticados cerca de 32% dos casos, representando um *déficit* de quase 70 famílias. O serviço de Oncogenética, por motivos óbvios, não é um serviço de busca direta e depende, portanto, do encaminhamento advindo de outros setores do hospital de pacientes que julguem suspeitos. Segundo os critérios de Bethesda, todo paciente diagnosticado com CCR antes dos 50 anos é um suspeito para SL. Dos 2,023 mil casos citados, 400 tinham 50 anos ou menos. Dos 504 probandos atendidos na Oncogenética no período, 76 eram casos de CCR com 50 anos ou menos. Portanto, 324 casos não tiveram a oportunidade de chegar até o serviço, o que sem dúvida colabora para o *déficit* diagnóstico observado, além de possivelmente gerar viés de seleção para esse estudo.

Em relação aos probandos incluídos, algumas das características que puderam ser observadas estão de acordo com a literatura, enquanto outras revelam diferenças. A idade média de 41 anos ao diagnóstico se aproxima da faixa de 45 anos citada na literatura, e a grande maioria dos tumores índice dos probandos pertenciam ao espectro clássico da síndrome (84%). Se considerarmos o espectro de tumores presentes em todos os familiares, ele foi bastante amplo, incluindo 23 diferentes sítios primários, além de um caso confirmado de neoplasia de sítio primário oculto e 10 casos em que os probandos não souberam informar especificamente o sítio de origem dos tumores de alguns indivíduos afetados (Tabela 3, Resultados). Entre esses 23 sítios primários, 11 são relacionados à SL

(CCR, estômago, tumores uroteliais, endométrio, ovário, SNC, intestino delgado, adenoma e carcinoma sebáceos, pâncreas e vesícula biliar) e 12 não (mama, próstata, pulmão, leucemia, cabeça e pescoço, esôfago, sarcoma, testículo, fígado, melanoma, pele não melanoma e colo uterino).

Dos 165 tumores observados em todos os probandos e familiares, os sítios mais frequentemente observados foram, na sequência: colorretal (49%), estômago (7,9%), mama (5,5%), urotelial (4,2%), endométrio (3%), ovário (3%) e sistema nervoso central (3%). Dados do *Prospective Lynch Syndrome Database* (PLSD) publicados recentemente, originados de 6350 portadores de mutação germinativa em um dos genes de reparo, descreveram a ocorrência de 1808 tumores nesses pacientes, sendo os mais comuns os tumores colorretais (39,1%), seguidos dos de endométrio (9,6%), uroteliais (6,3%), mama (4,7%), próstata (3,3%), ovário (3,2%) e intestino delgado (2,9%). Logo, chama atenção a escassez de casos de câncer de endométrio na nossa casuística ($p=0.005$). Ao analisar os sítios primários dos 504 probandos avaliados pelo serviço de Oncogenética no período entre 2012 e 2018, concluímos que provavelmente se trata de um viés de encaminhamento, já que apenas cinco probandas com tumor de endométrio foram avaliadas pelo serviço.

Em contrapartida, três probandas apresentaram câncer de mama como seu tumor índice, o que fez da mama o tumor índice extracolônico mais frequente entre os nossos probandos. Assim como na nossa casuística, uma publicação brasileira sobre a frequência de tumores extracolônicos em pacientes com câncer colorretal hereditário baseada no banco de dados do Hospital AC Camargo também traz o câncer de mama como o mais frequente (DA SILVA et al., 2010). Na nossa série, uma das probandas com tumor índice em mama tinha família preenchendo critérios de Amsterdam, mas as outras duas só foram identificadas como portadoras da SL devido à realização de painel multigene em detrimento de pesquisa de mutação de *BRCA1/BRCA2* guiada pelo fenótipo, pois suas famílias só preenchiam critérios para investigação de HBOC. Os menores custos dos testes genéticos, consequentes à rápida evolução das técnicas de sequenciamento, fazem com que a realização de painel multigene seja mais custo-efetiva do que a pesquisa gene-a-gene (HALL et al., 2014; GALLEGU et al., 2015), e esse fato deve colaborar para a expansão dos nossos conhecimentos sobre o espectro de tumores que conhecemos atualmente para as síndrome de predisposição a câncer hereditário.

O uso mais disseminado da pesquisa molecular de MSI desde a aprovação do pembrolizumabe também colabora para a expansão do conhecimento sobre o espectro de tumores da SL. Dentro desse contexto, alguns dos tumores atípicos observados nos nossos probandos, como câncer de mama e sarcoma, foram citados num estudo que estudou a presença de MSI-*high* em mais de 50 tipos de câncer de mais de 15 mil pacientes não selecionados (LATHAM et al., 2019). Dos 15 mil tumores, 326 (2,2%) eram MSI-*high*, incluindo 150 tumores de mama e 45 sarcomas. De forma interessante, não foi detectada mutação germinativa dos genes de reparo em nenhum dos 150 pacientes com câncer de mama MSI-*high* desse estudo, porém, a SL foi confirmada em 7 pacientes com tumores de mama MSS. Além disso, 2 dos 45 sarcomas MSI-*high* tiveram o diagnóstico de SL confirmado. No caso da nossa população, não foi realizada IHQ dos tumores das três probandas com câncer de mama, não sendo possível avaliar se esses eram MSS ou MSI-*high*. No caso da probanda com lipossarcoma, a IHQ do tumor demonstrou perda de MSH2/MSH6, compatível com a mutação germinativa detectada em *MSH2*.

Ainda sobre a ocorrência de tumores não esperados para a SL, vários estudos demonstram a sobreposição de fenótipos entre as mais variadas síndromes. Essa questão fica muito bem exemplificada pela probanda P30, diagnosticada com lipossarcoma aos 18 anos e osteossarcoma aos 20 – diagnósticos totalmente sugestivos da síndrome de Li-Fraumeni, mas relacionados aqui à uma mutação de *MSH2*. Estudos recentes incluindo uma quantidade bastante significativa de pacientes revelam que 5-7% das pacientes que preenchem critérios para investigação de HBOC, quando submetidas a painel multigene, chegam ao diagnóstico de SL (BUYS et al., 2017; ROSENTHAL et al., 2017). Atualmente, a maior parte dos painéis comercialmente disponíveis voltados especificamente à investigação de câncer de mama e ovário hereditários inclui os genes da SL.

Esses achados também trazem à tona a discussão emergente sobre a inclusão do câncer de mama no espectro da SL (EVANS et al., 2018; ROBERTS et al., 2018; LU et al., 2019). Alguns estudos sugerem inclusive que *MSH6* e *PMS2*, que historicamente sempre foram considerados os genes MMR menos frequentemente envolvidos na SL, sejam na verdade os mais frequentes, e que essa frequência esteja encoberta por um fenótipo atípico, mais semelhante à HBOC (ESPENSCHIED et al., 2017). Além das três probandas com tumor de mama como sítio primário, ao se avaliar o espectro tumoral também dos familiares, os tumores de

mama apareceram como o terceiro sítio mais comum, com um total de nove ocorrências (Tabela 3). Um argumento que logo surge é o fato de os tumores de mama são os mais frequentes entre as mulheres (INCA, 2019); logo, alguns dos casos observados poderiam representar fenocópias. Porém, fazendo uma analogia com os casos de câncer de próstata, o mais comum em homens (INCA, 2019), foram observados apenas quatro casos; somando a esses os casos de câncer de pulmão, também bastante frequente, chegaríamos a oito ocorrências – permanecendo abaixo do número de casos de câncer de mama isoladamente. Infelizmente, os números são baixos para permitir quaisquer conclusões, mas frente às discussões na literatura, o achado é instigante.

Considerando essas informações e que os tumores de mama e pacientes com fenótipo sugestivo de HBOC são os casos mais frequentemente atendidos no ambulatório de Oncogenética, é possível que o fato de não termos contemplado os tumores de mama como um sítio potencialmente relevante durante a seleção de pacientes suspeitos possa ter resultado na não identificação de uma parcela não desprezível de casos de SL. Os protocolos NCCN para câncer de mama e ovário hereditários citam que alguns estudos sugerem que a SL possa estar associada a um aumento de risco para câncer de mama, mas concluem que não há evidências para apoiar rastreamento diferente do sugerido para a população geral (NCCN, 2019b).

A presença de mais de um tumor foi observada em 15 pacientes (46,9%), incluindo tanto casos de tumores sincrônicos quanto metacrônicos. A associação mais comum foi a de mais de um CCR no mesmo paciente, o que ocorreu em oito pacientes (sendo cinco pacientes com dois tumores colorretais e três pacientes com três tumores colorretais). Entre esses oito casos, um foi representado por um paciente que teve dois tumores identificados numa mesma peça cirúrgica, enquanto os outros sete pacientes foram diagnosticados como novos tumores após ressecções segmentares do cólon ou do reto. Sendo assim, entre 27 pacientes que tiveram um tumor colorretal submetido a ressecção segmentar, 7 apresentaram lesões metacrônicas no seu seguimento, resultando numa taxa de 25,9% de pacientes com CCR metacrônico durante um tempo médio de seguimento de 9,3 anos ($\pm 9,2$) entre o diagnóstico do primeiro tumor e a última consulta na Oncogenética. A literatura cita taxas de CCR metacrônico de 16% em 10 anos, 41% em 20 anos e até 62% em 30 anos para pacientes com SL (PARRY et al., 2011).

Considerando a taxa esperada em 10 anos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os nossos achados e a literatura ($p=0,31$). Entre os quatro pacientes que apresentaram tumores sincrônicos, dois casos envolviam tumores de sítio colorretal, resultando numa taxa de 7,4% de CCR sincrônico – também semelhante à taxa de 7% relatada na literatura (WIN et al., 2015). Considerando a alta taxa de ocorrência de tumores colorretais metacrônicos e o fato de o CCR ser um tumor potencialmente prevenível pela realização de colonoscopia (WINAWER et al., 1993), se esses pacientes estivessem incluídos em protocolos de seguimento endoscópico anual, provavelmente uma parcela desses tumores teria sido evitada.

Também está em concordância com a literatura o fato de apenas 2 dos 36 tumores colorretais diagnosticados terem se apresentado em estágio clínico IV (metastático), já que o CCR associado à SL sabidamente tem um prognóstico melhor em relação aos tumores MSS (DRESCHER; SHARMA; LYNCH, 2010; KIM et al., 2016a).

A sensibilidade dos critérios de Amsterdam I/II observada nesse estudo (43,3% entre os pacientes em geral; 55,6% entre os pacientes com diagnóstico confirmado por teste genético) foi ainda mais baixa do que a de 61-75% (SYNGAL et al., 2000; CHEN et al., 2006) sugerida na literatura ($p=0,009$). Note-se que essa baixa sensibilidade se deu mesmo na presença do viés de seleção causado pelo fato de o preenchimento desses critérios ser um dos critérios de inclusão no estudo, reforçando a limitação dos mesmos para uso na prática clínica. Os critérios de Bethesda, conforme esperado, tiveram um desempenho bastante melhor (sensibilidade 87,5%). Quatro (12,5%) dos probandos não preenchiam nenhum critério sugestivo de SL, reforçando a importância do rastreamento universal como um esforço para a detecção de um maior número de casos. Obviamente, a instituição do rastreamento universal depende da instalação de uma logística que passa por questões estruturais, financeiras e de pessoal capacitado, que ainda são uma barreira a ser vencida, principalmente no sistema público de saúde.

Entre os pacientes que não preenchiam nenhum critério clínico para SL, um dos mais instigantes é o caso da probanda P30, diagnosticada com um lipossarcoma aos 18 anos, um osteossarcoma aos 20 e foi a óbito aos 21 anos em decorrências de metástases pulmonares (doença extensa e progressiva em vigência de quimioterapia com docetaxel e gemcitabina). O termo sarcoma abrange um grupo diverso de tumores sólidos que podem surgir em qualquer sítio anatômico, com

predileção por partes moles e ossos (como no caso da nossa paciente). Apesar dos avanços no campo da Oncologia nos últimos anos, as opções de tratamento para esses tumores continuam limitadas, com a ressecção cirúrgica constituindo o pilar principal (NCCN, 2019c). Síndromes hereditárias relacionadas à ocorrência de sarcomas incluem principalmente a síndrome de Li-Fraumeni e a neurofibromatose; esses tumores não fazem parte, formalmente, do espectro da SL, embora existam alguns relatos de caso (NILBERT et al., 2009).

Por se tratar de uma doença muitas vezes agressiva e com poucas opções de tratamento, um estudo recente investigou a frequência de dMMR em sarcomas. Entre 304 tumores estudados, 7 apresentaram dMMR (2,3%), mas só 1 desses casos teve o diagnóstico de SL. Três desses sete pacientes receberam pembrolizumabe (como segunda, quarta e oitava linha de tratamento), mas devido aos pequenos números, não foi possível concluir se a deficiência de reparo em sarcomas é um bom marcador de resposta à imunoterapia (DOYLE et al., 2019). Por outro lado, em um caso reportado por Tlemsani et al., um paciente de 19 anos com um rabiomiossarcoma pleomórfico na coxa foi diagnosticado com SL por mutação de *MLH1* durante sua investigação genética; após progressão de doença com metástases pulmonares em vigência de quimioterapia convencional, optou-se por imunoterapia com nivolumabe – o paciente apresentou resposta completa das lesões pulmonares, sustentada após um ano de seguimento (TLEMSANI et al., 2018). Como vimos no item 2.2.7, a presença de instabilidade de microssatélites sempre levanta a possibilidade de resposta à imunoterapia, havendo indicação desse tratamento em tumores avançados e irresssecáveis, como era o caso dessa paciente. Porém nem ela, nem nenhum dos pacientes incluídos nesse estudo receberam a indicação de pembrolizumabe, até o momento. Apesar da sua indicação agnóstica, a droga não está disponível no SUS. Estão disponíveis na internet as atas de reunião da Comissão Nacional de Incorporação de Novas Tecnologias no SUS (CONITEC), e na ata da 75ª reunião, ocorrida em março de 2019, consta a solicitação para que o grupo elaboradores de Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas (DDT) realizasse os estudos necessários para um Parecer Técnico-científico (PTC) das tecnologias nivolumabe e pembrolizumabe para avaliação de incorporação ao SUS e posterior análise da DDT, no cenário dos melanomas metastáticos. Em dezembro de 2019 foi publicado um relatório recomendando que o tema seja submetido à consulta pública, mas com “recomendação preliminar

desfavorável à incorporação no SUS de imunoterapia para o tratamento de primeira linha de pacientes com melanoma metastático, pois apesar destas terapias apresentarem maior eficácia em relação à dacarbazina, o elevado custo do tratamento produziu uma relação de custo-efetividade e um impacto orçamentário incrementais que inviabilizam a sua incorporação” (CONITEC, 2019).

Um dos pontos da nossa casuística que diverge dos dados da literatura é a parcela de casos atribuída a cada um dos genes de reparo. Na nossa população, houve uma menor proporção de casos relacionados a *MLH1* e *MSH2* (62,5% vs. 90%, $p=0.0002$), às custas principalmente de uma menor fração relacionada a *MLH1*; observamos também uma porcentagem de casos associados a *PMS2* bem mais alta que o previamente relatado (21,9% vs. 3%, $p=0.004$). Dados recentes especulam a possibilidade de a frequência real dos casos de SL por *PMS2* estar subestimada na literatura. Além da possível explicação especulada anteriormente, relacionada a um possível mascaramento da frequência de *PMS2* por um possível fenótipo mais semelhante à HBOC do que sugestivo de SL propriamente, outros estudos recentes podem justificar nosso achado. Em uma publicação de Win et al. (2017), dados de uma coorte de pacientes com CCR que foram triados para mutações nos genes MMR e do gene *MUTYH* foram utilizados para estimar a frequência populacional de mutações nesses genes. Os resultados demonstraram que, entre os genes de reparo, *PMS2* é o mais frequentemente mutado, seguido de *MSH6*, *MLH1* e *MSH2*. Outra possibilidade é o fato de que algumas mutações em *MLH1* podem resultar numa proteína mutante sem função, porém antigênica, de modo que ela continuaria presente na IHQ, enquanto sua parceira obrigatória, *PMS2*, estaria ausente de forma isolada. Assim, visto que nenhum dos pacientes incluídos cuja imunoistoquímica demonstrou perda de *PMS2* realizou teste genético, é possível que uma parcela desses casos seja secundária à mutação germinativa em *MLH1*, e não (SHIA, 2008; DUDLEY et al., 2015; ROSTY et al., 2016; SILVA et al., 2017) Essa possibilidade poderia explicar tanto o excesso de *PMS2* quanto a carência de *MLH1* na nossa população.

Houve um caso de paciente com adenocarcinoma de cólon sigmoide aos 47 anos cuja IHQ demonstrou perda de *PMS2* que realizou teste genético. Foi optado por um painel multigene incluindo 17 genes relacionados a CCR hereditário, incluindo os genes de reparo, validado para análise de CNV, cujo resultado foi normal. A paciente foi então excluída. Apesar desse resultado normal, é conhecido o

fato de que a testagem do gene *PMS2* representa um desafio laboratorial, devido à existência de pseudogenes (vide tópico 2.2.2).

Em relação aos pacientes incluídos apenas pelo critério de IHQ, e que estão sendo seguidos ambulatorialmente como síndrome de Lynch com base nesse critério, sabemos que essa estratégia está longe do ideal. Inclusive, esse é um dos fatores que pode estar falseando os nossos dados referentes à distribuição de casos entre os genes causais. A possibilidade de inativação somática bialélica (tumor-Lynch) de um dos genes de reparo já está bem estabelecida na literatura (SOURROUILLE et al., 2013; GEURTS-GIELE et al., 2014; MENSENKAMP et al., 2014;), inclusive com algumas fontes sugerindo substituição do teste de sequenciamento germinativo pelo somático na investigação da SL (HAMPEL et al., 2018).

A investigação da SL apenas com IHQ, sem continuidade do fluxograma e realização de teste genético, gera um contingente de pacientes que são todos mantidos em seguimento diferencial, pois não é possível discernir, sem o teste, quais deles de fato tem SL ou não. Nos casos com perda das proteínas *MLH1/PMS2*, especificamente, existe a possibilidade da pesquisa da mutação *BRAF* V600E (vide tópico 2.2.5), mas essa pesquisa não é realizada em pacientes não metastáticos no nosso serviço. Sendo assim, nos casos em que, além da IHQ anormal, existe uma história familiar de alto risco, os familiares dos probandos selecionados por IHQ também são orientados a realizar um seguimento mais rigoroso, baseado nos tumores presentes na família. Essas orientações deveriam representar exceções, mas estão funcionando como regra no nosso serviço, já que, apenas para SL, existem 22 casos dos 32 aqui descritos que se encontram nessa situação. Na presença de inativação somática bialélica, estaríamos fazendo um seguimento dispendioso e desnecessário desses pacientes e de seus familiares. Além disso, está bem definido hoje na literatura que o valor da IHQ fora de um serviço com *expertise* na técnica pode ser limitado (OVERBEEK et al., 2008; KLARSKOV et al., 2010), e a questão das IHQ incongruentes e resultados revisados diferentes do inicial aqui apresentados trazem essa questão à tona. A realização simultânea de pesquisa molecular de MSI poderia ajudar nesses casos, porém ela não está disponível no sistema público de saúde.

Uma avaliação interessante que pode ser feita sobre os resultados de IHQ obtidos no nosso serviço é a comparação entre esses resultados e o resultado do

teste genético, no caso dos pacientes que o realizaram. Observa-se no Quadro 4 que, entre os dez pacientes testados, seis tiveram um de seus tumores submetidos a IHQ, incluindo quatro CCR, um sarcoma e um tumor de endométrio. Nenhum dos seis casos apresentou IHQ normal. Em quatro casos (probandos P5, P20, P25 e P30), incluindo três CCR e o sarcoma, o resultado da IHQ foi compatível com a mutação germinativa detectada – perda de MSH2/MSH6 em três casos de mutação de *MSH2* e perda de MLH1/PMS2 num caso de mutação de *MLH1*. Nos outros dois casos (P3 e P9), ambos os pacientes apresentaram mutação germinativa em *MSH2*, e o resultado da IHQ demonstrava perda de MLH1/MSH2/MSH6. A perda adicional de MLH1 na IHQ não está descrita como um padrão previsto nos protocolos NCCN (NCCN, 2019a), mas como resultado anormal equívoco, chamaria atenção para a necessidade de investigação adicional (OVERBEEK et al., 2008; SHIA, 2008). Concluimos então que, apesar de se tratar de uma estratégia não ideal, já que a IHQ deveria servir como exame de rastreamento e não de diagnóstico final, ela ainda é o único método com o que o serviço pode contar na identificação desses pacientes sem gerar custo adicional e, nos casos observados, cumpriu o seu papel de selecionar pacientes que mereciam investigação adicional. Porém, não sabemos quantos dos pacientes suspeitos para SL e que não foram aqui incluídos por apresentarem IHQ normal poderiam ter o diagnóstico confirmado se submetidos a teste genético – nos casos em que persistir forte suspeita de SL apesar do rastreamento com IHQ normal, persiste a indicação de aconselhamento genético e possível teste, principalmente num cenário em que não é realizada a pesquisa molecular de MSI associada à IHQ (OVERBEEK et al., 2008; NCCN, 2019a).

Por todos os motivos aqui citados, apesar de gerarem um custo imediato inicial, o rastreamento universal de todos os tumores colorretais com IHQ e/ou pesquisa molecular de MSI, seguido de teste genético para os que tiverem resultados anormais, são a maneira de se diagnosticar a SL com melhor custo-benefício. O rastreamento universal, seguido de AG e realização de teste nos indivíduos cujo tumor apresente resultados anormais, já provou sua custo-efetividade relacionada a diminuição de casos de câncer (com o custo associado para tratá-los) a longo prazo (MVUNDURA et al., 2010). A realização reflexa de IHQ ou pesquisa de MSI em todos os tumores colorretais já é uma realidade em grandes centros internacionais, como a *Cleveland Clinic Foundation*, há mais de dez anos, com resultados publicados demonstrando maior taxa de identificação de pacientes

com SL através dessa estratégia (HEALD et al., 2013). O Hospital Erasto Gaertner é um centro de referência no tratamento do câncer no sul do Brasil e, pela sua relevância, é de muita importância que busque atender a protocolos internacionais de excelência.

Nesse grupo de pacientes altamente suspeitos para SL, a taxa de realização do teste genético foi bem pouco expressiva – apenas 14 dos 36 (38,9%) probandos que inicialmente preenchiam critérios de inclusão para esse estudo tiveram acesso a teste genético. Desse 14, quatro foram excluídos por não terem mutação germinativa demonstrada no teste genético. Todos os quatro pacientes excluídos realizaram painel multigene incluindo os genes de reparo, porém em apenas um caso foi realizado painel validado para análise de CNV. Os outros três pacientes não foram incluídos nesse estudo, mas seguem em acompanhamento no ambulatório com indicação de continuidade da investigação com MLPA ou outra técnica para avaliação de CNV. Conforme citado previamente, SL causada por CNV de um dos genes de reparo pode ser tão frequente quanto 20 e 40% dos casos relacionados aos genes *MSH2* e *PMS2*, respectivamente (KOHLMANN; GRUBER, 2004; SMITH et al., 2016). Um estudo prévio de descrição clínica e molecular da SL em indivíduos de toda a América Latina encontrou, entre 220 variantes distintas nos quatro genes MMR e no gene *EPCAM*, 11% de grandes deleções/duplicações (ROSSI et al., 2017). Logo, a ocorrência dessas alterações não pode ser negligenciada, embora os custos adicionais gerados pela continuidade da investigação representem mais uma dificuldade a ser ultrapassada no contexto do SUS.

Embora ser dependente do SUS seja uma limitação ao acesso ao diagnóstico molecular por si só, visto que a IHQ é a única etapa do fluxograma diagnóstico a que esses pacientes têm acesso sem custo adicional, acreditamos que outras questões de complexidade muito maior estejam envolvidas nessa baixa taxa de confirmação diagnóstica molecular. Conforme demonstrado nos nossos resultados, a população incluída nesse estudo é formada basicamente por pessoas cujo grau de instrução não ultrapassa a conclusão do Ensino Médio, com uma fatia importante tendo passado apenas pelo Ensino Fundamental. O nível de escolaridade tem o potencial teórico de impactar nesse processo diagnóstico, na concepção da autora, de duas maneiras. Primeiramente, os testes genéticos para investigação de síndromes hereditárias de predisposição ao câncer não são oferecidos pelo SUS, e a sua realização no âmbito particular tem um custo que gira

em torno de 1,5 mil reais; não raro, esse valor por si só é impeditivo para alguns pacientes. Em segundo lugar, embora os médicos do serviço de Oncogenética tenham por hábito utilizar linguagem simples, que facilite a compreensão do paciente em relação à sua suspeita diagnóstica e a importância de confirmá-la ou não, sabemos que a Genética é uma área do conhecimento complexa, muitas vezes pouco entendida pela própria comunidade médica. Cenários análogos na prática médica nos mostram que a compreensão, por parte do paciente, do processo saúde-doença e das suas implicações é importante para que haja aderência às recomendações médicas (MAYO-GAMBLE; MOUTON, 2017). Logo, o baixo nível de escolaridade pode refletir tanto na capacidade financeira para a realização do teste, quanto no grau de entendimento da importância da sua realização. As barreiras sociais, culturais e éticas relacionadas à realização de AG e teste genético em países subdesenvolvidos já são uma questão reconhecida na literatura (MELO; SEQUEIROS, 2012; ZHONG et al., 2018); porém, estratégias objetivas para contorná-las ainda são necessárias.

Outro dado bastante desapontador encontrado nesse estudo, além da baixa taxa de realização do teste, foi a pequena parcela (30%) de pacientes testados que trouxe seus familiares para AG e teste genético em cascata. O baixo uso do teste em cascata diminui a custo-efetividade do diagnóstico molecular, já que um maior número de familiares testados resulta em: 1) identificação de familiares que não são portadores da mutação familiar e que podem, portanto, ser excluídos dos programas de rastreamento diferencial; 2) identificação de familiares portadores da mutação, que são possíveis futuros portadores de tumores – a prevenção desses casos impacta na diminuição dos futuros gastos com esse tratamento. Esses benefícios são progressivamente maiores quando diluídos entre mais familiares em risco (HAMPEL, 2016).

É importante salientar que, uma vez identificada a mutação familiar, a pesquisa pontual dessa mutação tem um custo menor do que a realização do painel (em torno de 600 reais) e, inclusive, alguns laboratórios no mercado oferecem essa pesquisa gratuitamente para os familiares interessados de um probando que tenha sido inicialmente testado e detectado com uma variante provavelmente patogênica ou patogênica. Nesse ponto, sentimos que o principal problema não é mais o custo do exame, mas sim a transmissão da informação aos familiares, a presença de uma rede de apoio que sustente os familiares assintomáticos com mutação detectada e

as próprias questões sociais, culturais e de compreensão já citadas. Porém, uma questão muito relevante do ponto de vista financeiro é que, em alguns casos, o custo do exame, apesar de reduzido, ainda é um impeditivo para algumas famílias; nesses casos, é comum que enquanto os familiares “se organizam financeiramente” para a pesquisa da mutação, eles permaneçam em seguimento no hospital. Isso porque, segundo os protocolos da NCCN, numa família em que sabidamente há um portador de mutação, seus familiares em risco não testados devem ser seguidos como se fossem portadores da mutação (NCCN, 2019a). Sendo assim, embora os cálculos de custo-efetividade não façam parte do escopo desse estudo, é perceptível sem muito esforço que o custo de algumas colonoscopias e exames de imagem logo ultrapassará o custo da pesquisa da mutação pontual – lembrando que existe a chance de 50% de se estar seguindo um familiar negativo para a mutação. Dentro desse contexto, estratégias para aumentar a realização de teste em cascata se mostram necessárias na nossa população e envolvem tanto questões de subsídio financeiro quanto de captação dos pacientes em risco.

Ainda sobre a questão de custo-benefício do diagnóstico molecular, para fins de exemplificação: conforme demonstrado nos nossos resultados, 100% dos probandos que tiveram tumores metacrônicos no seu seguimento já tinham critérios sugestivos de hereditariedade desde o seu primeiro diagnóstico. Foram, ao todo, 15 pacientes com 25 tumores metacrônicos no total, sendo 16 desses tumores potencialmente preveníveis (15 casos de CCR e um de endométrio, potencialmente prevenível por histerectomia profilática). Considerando apenas os casos de CCR, a realização do teste desses 15 indivíduos teria gerado uma despesa média de 22,5 mil reais. Em 2016, o sanitarista Tiago Cepas Lobo, graduado em Saúde Pública pela Universidade de São Paulo, publicou um relatório referente a estimativa dos custos de tratamento de pacientes com câncer de mama, cólon, reto, pulmão e linfoma de Hodgkin no SUS (LOBO, 2016), conforme o estágio clínico. Para esses 15 tumores, incluindo 13 de cólon e 2 de reto, o estadiamento ao diagnóstico estava disponível para 11 deles (sendo 2 EC I, 6 EC II e 3 EC III). Para os 4 não disponíveis, consideramos EC I, contabilizando os menores custos. Dessa forma, chegamos numa despesa estimada de aproximadamente 285 mil reais para o tratamento desses 15 tumores, com os custos variando de 4,1 mil reais para o tratamento de um tumor de cólon EC I a 78,9 mil reais para um tumor de reto EC III. Obviamente, estamos cientes que além dos custos associados ao teste genético,

simplesmente, o diagnóstico de SL gera gastos relacionados a colonoscopias e exames de imagem frequentes, que não estimamos aqui. Além disso, não temos como prever a parcela desses tumores que seriam de fato prevenidos, pois não sabemos quantos dos pacientes teriam teste com resultado positivo, nem quantos deles teriam uma aderência adequada ao rastreamento endoscópico anual. De qualquer forma, fica demonstrado que os custos de tratamento são consideravelmente mais altos do que os da testagem em si. Novamente, a questão do custo-benefício do rastreamento universal da SL seguido de teste molecular para os resultados anormais já está amplamente demonstrada na literatura e não faz parte do escopo desse estudo comprovar esses fatos (MVUNDURA et al., 2010; LADABAUM et al., 2011; KANG et al., 2020).

Os custos associados à medicina genômica e de precisão vêm abrindo profundas cisuras que dividem a maneira como pacientes com mais ou menos recursos são diagnosticados, seguidos e tratados para múltiplas condições. Entendemos que a imunoterapia, por exemplo, com seus altíssimos custos, é um dos exemplos dessa segregação que pode ser mais difícil de ultrapassar, dentro do contexto dos recursos limitados do SUS. Já o teste genético tem custo similar a outras modalidades diagnósticas e terapêuticas oferecidas pelo sistema público, e os seus custos não deveriam ser um obstáculo no caminho que leva à prevenção do câncer.

Também é relevante notar que os indivíduos acometidos por câncer hereditário, conforme aqui demonstrado, têm uma idade de diagnóstico muito mais jovem do que aquela vista para o câncer esporádico e, portanto, são diagnosticados num momento que representa a fase produtiva da sua vida. Sendo assim, o impacto financeiro causado por esses casos (em grande parte preveníveis, no caso da SL) não está relacionado apenas ao tratamento em si, mas também a outras questões de cunho social relacionadas à não produtividade e ao amparo a esse indivíduo, incluindo o absenteísmo no trabalho, auxílio doença, amparo assistencial, outros benefícios pagos pelo Instituto Nacional do Seguro Social (INSS) e até aposentadoria por invalidez.

O gene *MSH2* foi o gene causal mais frequente no nosso grupo, totalizando 13 casos, dos quais sete foram incluídos pelo critério de imunistoquímica e seis pelo critério de teste genético. Entre os 10 pacientes incluídos que tiveram acesso ao teste genético, cinco probandos não relacionados apresentaram a mesma

mutação em *MSH2*, a saber: c.2152C>T (p.Gln718*). Em relação ao fenótipo desses cinco probandos, três apresentaram achados bastante típicos da SL: um paciente com tumor de retossigmoide aos 29 anos, com família preenchendo AC II; um paciente com tumor de cólon aos 46 anos, com família preenchendo AC I; um paciente com tumor de pelve renal aos 63 anos com família preenchendo AC II. Nos outros dois casos, o sítio do tumor índice foi atípico, sendo um caso de câncer de mama aos 43 anos (mas com família preenchendo AC I) e um de lipossarcoma aos 18 anos. O preenchimento de critérios de Amsterdam por quatro das cinco famílias, além do diagnóstico em idade bastante jovem no quinto caso, corroboram com uma aparente alta penetrância e fenótipo agressivo da variante.

A mutação *MSH2*:c.2152C>T (p.Gln718*) foi originalmente descrita por Isidro et al. em 1999 (ISIDRO et al., 2000) numa família portuguesa preenchendo critérios de Amsterdam – maiores detalhes clínicos não foram descritos nesse trabalho original. A mutação voltou a ser descrita por um grupo da Universidade de São Francisco, na Califórnia (TERDIMAN et al., 2002); um de Lisboa, Portugal (LAGE et al., 2004); um de Paris, França (EWALD et al., 2007); e, finalmente, por um grupo do Brasil (São Paulo) (MONTEIRO SANTOS et al., 2012). Nesse último estudo, que descreveu 88 probandos não relacionados que apresentaram 31 mutações patogênicas distintas, essa mutação constituiu a mais frequentemente observada, tendo sido detectada em seis indivíduos não relacionados; todas as outras mutações foram observadas apenas uma vez cada. O estudo não discutiu esse achado. No mesmo estudo de descrição de SL na América Latina citado no parágrafo anterior, entre as 220 variantes descritas, *MSH2*:c.2152C>T (p.Gln718*) foi a que apareceu em mais famílias não relacionadas – 9 famílias; apenas 45 das 220 variantes apareceram em 2 ou mais famílias, e pouquíssimas apareceram em mais de 4 famílias (ROSSI et al., 2017). Dessa vez, o achado foi apenas comentado. Finalmente, a variante foi relacionada a um efeito fundador num estudo recente de um grupo de Porto, Portugal (PINHEIRO et al., 2019). Nesse estudo, a variante foi detectada em 28 famílias aparentemente não relacionadas, originárias da região norte de Portugal. Vinte dessas famílias preenchiam critérios de Amsterdam e quatro preenchiam algum critério de Bethesda. Doze haplótipos diferentes foram inferidos para 13 dos 28 probandos, e eles compartilhavam uma região conservada de aproximadamente 3,6 megabases. A idade estimada da mutação foi de 273±64 anos.

Não encontramos estudos publicados até o presente momento que sugiram que *MSH2*:c.2152 (p.Gln718*) possa ser uma mutação fundadora no Brasil. Apesar do nosso número bastante pequeno de pacientes testados, nos parece bastante intrigante que entre os pacientes com IHQ com perda de *MSH2* que “randomicamente” tinham possibilidade financeira de fazer o teste, quase a totalidade apresente a mesma mutação. Em relação à ancestralidade das famílias dos pacientes portadores dessa mutação, não foi possível obter esse dado em duas famílias; em outras duas famílias, a origem referida é portuguesa; em uma família, a probanda informou que desconhecia qualquer origem estrangeira, referindo apenas que a família era advinda de Guarapuava-PR.

A detecção de uma mutação fundadora no gene *MSH2* seria de extrema valia para a prática clínica, especialmente dentro do contexto do sistema público de saúde. A estratégia de pesquisa pontual da mutação fundadora *TP53*:c.1010G>A (p.Arg337His), ou R337H, é o único tipo de investigação genética que pode ser oferecida de maneira gratuita aos pacientes do HEG, através do Instituto de Pesquisa Pelé-Pequeno Príncipe, e rendeu no período desse estudo o diagnóstico de pelo menos 42 portadores, entre probandos e familiares. A pesquisa pontual da mutação *MSH2*:c.2152C>T (p.Gln718*) é muito mais viável financeiramente do que o sequenciamento completo do gene e análise de CNV nos casos de sequenciamento normal. Assim, caso fosse descoberto um efeito fundador, abriria-se a possibilidade de uma abordagem diagnóstica inicial mais acessível nos pacientes com IHQ sugerindo perda de *MSH2*, o que representaria mais um pequeno passo rumo à acessibilidade da Oncogenética para a população dependente do SUS.

7 CONCLUSÃO

- A taxa de ocorrência de tumores índices atípicos entre os nossos probandos foi de 15,6%, sendo importante o conhecimento desse fato para aumento do limiar de suspeição e, conseqüentemente, das taxas de diagnóstico de SL.
- A sensibilidade dos critérios de Amsterdam I/II nesse grupo de pacientes foi de apenas 43,3%, ainda mais baixa do que a sugerida pela literatura, corroborando a necessidade de rastreamento universal para otimizar o processo de identificação dos pacientes com SL.
- Foi observada uma taxa importante de tumores metacrônicos potencialmente evitáveis, principalmente tumores colorretais. Esse achado reforça a necessidade de melhorarmos a taxa de identificação/diagnóstico desses pacientes, para otimização do rastreamento de tumores e conseqüente prevenção.
- Observamos uma baixa taxa de realização de teste genético num grupo de pacientes altamente selecionados como suspeitos para SL. A questão financeira é um fator limitante importante para os pacientes do SUS e, portanto, a ampliação dessa taxa passa por questões de necessidade de subsídios financeiros, seja através do setor público ou por parceria com a iniciativa privada.
- Observamos também uma baixa taxa de realização de testes em cascata. Estratégias de educação e captação dos familiares em risco são necessárias, visando estender os benefícios do diagnóstico molecular ao maior número de indivíduos possível.
- Considerando o número de pacientes com câncer colorretal menores de 50 anos admitidos no Hospital Erasto Gaertner no período do estudo e a proporção desses pacientes que foram atendidos pelo serviço de Oncogenética, estimamos que ocorreu uma taxa de encaminhamento abaixo do ideal. A Oncogenética é uma especialidade pouco conhecida pelos pacientes, de forma que o próprio acesso depende da suspeição e encaminhamento pelas demais especialidades. Estratégias de educação da comunidade médica e a divulgação dos resultados desse estudo na

instituição, visando maior conscientização sobre a ocorrência da SL no nosso meio, podem ajudar a melhorar o acesso dos pacientes.

- Uma mutação recorrente foi observada no gene *MSH2*, podendo representar um efeito fundador local. Essa hipótese não foi testada por esse estudo, mas a sua confirmação poderia viabilizar a implantação de pesquisa de mutação pontual para os pacientes cujos tumores apresentassem perda de *MSH2/MSH6*. Essa medida, assim como todas as outras aqui sugeridas, visa aumentar a acessibilidade à Oncogenética, ao diagnóstico molecular e aos seus benefícios para os pacientes dependentes do sistema público de saúde.

REFERÊNCIAS

ACOG. Hereditary Cancer Syndromes and Risk Assessment. **Obstet Gynecol**, v. 134, n. 6, p. 143–149, 2019.

ARONSON, M. et al. Gastrointestinal findings in the largest series of patients with hereditary biallelic mismatch repair deficiency syndrome: Report from the international consortium. **American Journal of Gastroenterology**, v. 111, n. 2, p. 275–284, 2016.

BALMAÑA, J. et al. Familial risk-colorectal cancer: ESMO clinical practice guidelines. **Annals of Oncology**, v. 24, n. 6, p. 73–80, 2013.

BERG, A. O. et al. Recommendations from the EGAPP Working Group: Genetic testing strategies in newly diagnosed individuals with colorectal cancer aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome in relatives. **Genetics in Medicine**, 2009.

BOLAND, C. R. et al. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: Development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Research**, v. 58, n. 22, p. 4248–5257, 1998.

BOLAND, C. R. Evolution of the nomenclature for the hereditary colorectal cancer syndromes. **Familial Cancer**, v. 4, n. 3, p. 211–218, 2005.

BOLAND, C. R.; GOEL, A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2073–2087, 2010.

BOLAND, C. R.; LYNCH, H. T. The History of Lynch Syndrome. **Familial cancer**, v. 12, n. 2, p. 145–157, 2013.

BONADONA, V. et al. Cancer risks associated with germline mutations in MLH1, MSH2, and MSH6 genes in lynch syndrome. **JAMA - Journal of the American Medical Association**, v. 305, n. 22, p. 2304–2310, 2011.

BONNEVILLE, R. et al. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. **JCO Precision Oncology**, 2017.

BREMBECK, F. H.; ROSÁRIO, M.; BIRCHMEIER, W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of β -catenin. **Current Opinion in Genetics and Development**, v. 16, n. 1, p. 51–59, 2006.

BURN, J. et al. Effect of aspirin or resistant starch on colorectal neoplasia in the Lynch syndrome. **New England Journal of Medicine**, v. 359, p. 2567–2578, 2008.

BURN, J. et al. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: An analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 378, p. 2081–2087, 2011.

BUYS, S. S. et al. A study of over 35,000 women with breast cancer tested with a 25-gene panel of hereditary cancer genes. **Cancer**, v. 123, n. 10, p. 1721–1730, 2017.

CARETHERS, J. M. Differentiating Lynch-like from Lynch Syndrome. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 602–604, 2014.

CHEN, L. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, n. 5, p. 336–347, 2004.

CHEN, S. et al. Prediction of germline mutations and cancer risk in the lynch syndrome. **Journal of the American Medical Association**, v. 296, n. 12, p. 1479–1487, 2006.

CHURCH, J. M. Controversies in the surgery of patients with familial adenomatous polyposis and Lynch syndrome. **Familial Cancer**, v. 14, p. 447–451, 2016.

CONITEC. Terapia-alvo (vemurafenibe, dabrafenibe, cobimetinibe, trametinibe) e imunoterapia (ipilimumabe, nivolumabe, pembrolizumabe) para o tratamento de primeira linha do melanoma avançado não-cirúrgico e metastático. **Ministério da Saúde**, p. 1–88, 2019.

DA SILVA, F. C. et al. Frequency of extracolonic tumors in Brazilian families with Lynch syndrome: Analysis of a hereditary colorectal cancer institutional registry. **Familial Cancer**, v. 9, p. 563–570, 2010.

DA SILVA, F. C. et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have Lynch syndrome. **PLoS ONE**, v. 10, n. 10, p. e0139753, 2015.

DA SILVA, F. C. et al. Update on Hereditary Colorectal Cancer. **Anticancer Research**, v. 36, n. 9, p. 4399–4406, 2016.

DE JONG, A. E. et al. Microsatellite Instability, Immunohistochemistry, and Additional PMS2 Staining in Suspected Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 10, n. 3, p. 972–980, 2004.

DE JONG, A. E. et al. Decrease in mortality in Lynch syndrome families because of surveillance. **Gastroenterology**, v. 130, n. 3, p. 665–671, 2006.

DE VOS, M. et al. Novel PMS2 Pseudogenes Can Conceal Recessive Mutations Causing a Distinctive Childhood Cancer Syndrome. **American Journal of Human Genetics**, v. 74, p. 954–964, 2004.

DESCHOOLMEESTER, V. et al. Comparison of three commonly used PCR-based techniques to analyze MSI status in sporadic colorectal cancer. **Journal of Clinical Laboratory Analysis**, v. 20, n. 2, p. 52–61, 2006.

DIENSTMANN, R.; SALAZAR, R.; TABERNERO, J. The Evolution of Our Molecular Understanding of Colorectal Cancer: What We Are Doing Now, What the Future Holds, and How Tumor Profiling Is Just the Beginning. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, p. 91–99, 2014.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Mutation spectrum in South American Lynch syndrome families. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, v. 11, n. 1, p. 18, 2013.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Frequent mismatch-repair defects link prostate cancer to Lynch syndrome. **BMC Urology**, v. 16, n. 15, 2016.

DOMINGUEZ-VALENTIN, M. et al. Cancer risks by gene, age, and gender in 6350 carriers of pathogenic mismatch repair variants: findings from the Prospective Lynch Syndrome Database. **Genetics in Medicine**, v. 22, n. 1, p. 15–25, 2020.

DONDORP, W. J.; DE WERT, G. M. Policy: The ‘thousand-dollar genome’: An ethical exploration. **European Journal of Human Genetics**, v. 21, n. December 2010, p. S6–S26, 2013.

DONG, H. et al. Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: A potential mechanism of immune evasion. **Nature Medicine**, v. 8, n. 8, p. 793–800, 2002.

DOYLE, L. A. et al. Characteristics of mismatch repair deficiency in sarcomas. **Modern Pathology**, v. 32, p. 977–987, 2019.

DRESCHER, K. M.; SHARMA, P.; LYNCH, H. T. Current hypotheses on how microsatellite instability leads to enhanced survival of Lynch syndrome patients. **Clinical and Developmental Immunology**, p. Epub 2010 Jun 10, 2010.

DUDLEY, B. et al. Germline MLH1 mutations are frequently identified in lynch syndrome patients with colorectal and endometrial carcinoma demonstrating isolated loss of PMS2 immunohistochemical expression. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 39, n. 8, p. 1114–1120, 2015.

DUDLEY, J. C. et al. Microsatellite instability as a biomarker for PD-1 blockade. **Clinical Cancer Research**, v. 22, n. 4, p. 813–820, 2016.

DURATURO, F. et al. Association of low-risk MSH3 and MSH2 variant alleles with Lynch syndrome: Probability of synergistic effects. **International Journal of Cancer**, v. 129, n. 7, p. 1643–1650, 2011.

ENGEL, C. et al. Efficacy of Annual Colonoscopic Surveillance in Individuals With Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 2, p. 174–182, 2010.

ESPENSCHIED, C. R. et al. Multigene panel testing provides a new perspective on Lynch syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 22, p. 2568–2575, 2017.

ETZLER, J. et al. RNA-based mutation analysis identifies an unusual MSH6 splicing defect and circumvents PMS2 pseudogene interference. **Human Mutation**, 2008.

EVANS, D. G. et al. Are women with pathogenic variants in PMS2 and MSH6 really at high lifetime risk of breast cancer? **Genetics in Medicine**, v. 21, n. 8, p. 1878–1879, 2018.

EWALD, J. et al. Immunohistochemical staining for mismatch repair proteins, and its relevance in the diagnosis of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **British Journal of Surgery**, 2007.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B. A Genetic Model for Colorectal Tumorigenesis. **Cell**, v. 61, n. 5, p. 759–767, 1990.

FISHEL, R. et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. **Cell**, v. 75, n. 5, p. 1027–1038, 1993.

GALA, M. K. et al. Germline mutations in oncogene-induced senescence pathways are associated with multiple sessile serrated adenomas. **Gastroenterology**, 2014.

GALLEGO, C. J. et al. Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: A cost-effectiveness analysis. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 18, p. 2084–2091, 2015.

GELSOMINO, F. et al. The evolving role of microsatellite instability in colorectal cancer: A review. **Cancer Treatment Reviews**, v. 51, p. 19–26, 2016.

GENECARDS. **GeneCards®: The Human Gene Database**. Disponível em: <www.genecards.org>. Acesso em: 4 fev. 2020.

GEURTS-GIELE, W. R. et al. Somatic Aberrations Of Mismatch Repair Genes As A Cause Of Microsatellite-Instable Cancers. **The Journal of pathology**, v. 234, n. 4, p. 548–559, 2014.

GIARDIELLO, F. M. et al. Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Task Force on Colorectal Cancer. **Gastroenterology**, v. 147, n. 2, p. 502–526, 2014.

GOULD, G. M. et al. Detecting clinically actionable variants in the 3' exons of PMS2 via a reflex workflow based on equivalent hybrid capture of the gene and its pseudogene 06 Biological Sciences 0604 Genetics. **BMC Medical Genetics**, v. 19, n. 1, p. 176, 2018.

GRADY, W. M. Molecular basis for subdividing hereditary colon cancer? **Gut**, v. 54, n. 12, p. 1676–1678, 2005.

GUARINOS, C. et al. EPCAM germ line deletions as causes of lynch syndrome in Spanish patients. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 12, n. 6, p. 765–770, 2010.

GUINNEY, J. et al. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. **Nature Medicine**, v. 21, n. 11, p. 1350–1356, 2015.

HAANSTRA, J. F. et al. Quality colonoscopy and risk of interval cancer in Lynch syndrome. **International Journal of Colorectal Disease**, v. 28, p. 1643–1649, 2013.

HALL, M. J. et al. Gene panel testing for inherited cancer risk. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 12, n. 9, p. 1339–1346, 2014.

HAMPEL, H. et al. Feasibility of screening for Lynch syndrome among patients with colorectal cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 26, n. 35, p. 5783–5788, 2008.

HAMPEL, H. Genetic counseling and cascade genetic testing in Lynch syndrome. **Familial Cancer**, v. 15, n. 3, p. 423–427, 2016.

HAMPEL, H. et al. Assessment of tumor sequencing as a replacement for lynch syndrome screening and current molecular tests for patients with colorectal cancer. **JAMA Oncology**, 2018.

HAYWARD, B. E. et al. Extensive gene conversion at the PMS2 DNA mismatch repair locus. **Human Mutation**, v. 28, n. 5, p. 424–430, 2007.

HEALD, B. et al. Implementation of universal microsatellite instability and immunohistochemistry screening for diagnosing lynch syndrome in a large academic medical center. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 10, p. 1336–1340, 2013.

HUANG, P. W.; CHANG, J. W. C. Immune checkpoint inhibitors win the 2018 Nobel Prize. **Biomedical Journal**, v. 42, n. 5, p. 299–306, 2019.

INCA. Estimativa 2020 - Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019.

IONOV, Y. et al. Ubiquitous somatic mutations in simple repeated sequences reveal a new mechanism for colonic carcinogenesis. **Nature**, v. 363, n. 6429, p. 558–561, 1993.

ISHIDA, Y. et al. Induced expression of PD-1, a novel member of the immunoglobulin gene superfamily, upon programmed cell death. **The EMBO Journal**, v. 11, n. 11, p. 3887–3895, 1992.

ISIDRO, G. et al. Four novel MSH2 / MLH1 gene mutations in portuguese HNPCC families. **Human mutation**, v. 15, n. 1, p. 116, 2000.

IWAI, Y. et al. Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 19, p. 12293–7, 2002.

JÄRVINEN, H. J. et al. Controlled 15-year trial on screening for colorectal cancer in families with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Gastroenterology**, 2000.

JASS, J. R. Hereditary non-polyposis colorectal cancer: The rise and fall of a confusing term. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 31, p. 4943–4950, 2006.

JENKINS, M. A. et al. Pathology Features in Bethesda Guidelines Predict Colorectal Cancer Microsatellite Instability: A Population-Based Study. **Gastroenterology**, v. 133, n. 1, p. 48–56, 2007.

JOOST, P. et al. Urinary Tract Cancer in Lynch Syndrome; Increased Risk in Carriers of MSH2 Mutations. **Urology**, v. 86, n. 6, p. 1212–1217, 2015.

KALADY, M. F.; HEALD, B. Diagnostic Approach to Hereditary Colorectal Cancer Syndromes. **Clinics in Colon and Rectal Surgery**, 2015.

KANG, Y. J. et al. The predicted impact and cost-effectiveness of systematic testing of people with incident colorectal cancer for Lynch syndrome. **Medical Journal of Australia**, v. 212, n. 2, p. 72–81, 2020.

KANTH, P. et al. Hereditary Colorectal Polyposis and Cancer Syndromes: A Primer on Diagnosis and Management. **American Journal of Gastroenterology**, v. 112, n. 10, p. 1509–1525, 2017.

KIM, C. G. et al. Effects of microsatellite instability on recurrence patterns and outcomes in colorectal cancers. **British Journal of Cancer**, v. 115, n. 1, p. 25–33, 2016a.

KIM, J. H. et al. Distinct features between MLH1-methylated and unmethylated colorectal carcinomas with the CpG island methylator phenotype: Implications in the serrated neoplasia pathway. **Oncotarget**, v. 7, n. 12, p. 14095–14111, 2016b.

KLARSKOV, L. et al. Interobserver variability in the evaluation of mismatch repair protein immunostaining. **Human Pathology**, 2010.

KLOOR, M.; VON KNEBEL DOEBERITZ, M. The Immune Biology of Microsatellite-Unstable Cancer. **Trends Cancer**, v. 2, n. 3, p. 121–133, 2016.

KOCARNIK, J. M.; SHIOVITZ, S.; PHIPPS, A. I. Molecular phenotypes of colorectal cancer and potential clinical applications. **Gastroenterology Report**, v. 3, n. 4, p. 269–276, 2015.

KOHLMANN, W.; GRUBER, S. B. Lynch Syndrome. 2004 Feb 5 [Updated 2018 Apr 12]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1211/>>. Acesso em: 9 set. 2019.

KRAVOCHUCK, S. E. et al. Defining HNPCC and Lynch syndrome: What's in a name? **Gut**, v. 63, n. 9, p. 1525–1526, 2014.

KRAVOCHUCK, S. E.; CHURCH, J. M. Hereditary non-polyposis colorectal cancer/Lynch syndrome in three dimensions. **ANZ Journal of Surgery**, v. 87, n. 12, p. 1006–1010, 2017.

LADABAUM, U. et al. Strategies to Identify the Lynch Syndrome Among Patients With Colorectal Cancer: A Cost-Effectiveness Analysis. **Annals of Internal Medicine**, v. 155, n. 2, p. 69–79, 2011.

LAGE, P. A. et al. Association of colonic and endometrial carcinomas in Portuguese families with hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma significantly increases the probability of detecting a pathogenic mutation in mismatch repair genes, primarily the MSH2 gene. **Cancer**, 2004.

LAIHO, P. et al. Low-level microsatellite instability in most colorectal carcinomas. **Cancer Research**, v. 62, n. 4, p. 62–64, 2002.

LATHAM, A. et al. Microsatellite Instability is Associated With the Presence of Lynch Syndrome Pan-Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 4, p. 286–295, 2019.

LE, D. T. et al. PD-1 Blockade in Tumors With Mismatch-Repair Deficiency. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 26, p. 2509–2520, 2015.

LEGGETT, B.; WHITEHALL, V. Role of the Serrated Pathway in Colorectal Cancer Pathogenesis. **Gastroenterology**, v. 138, n. 6, p. 2088–2100, 2010.

LEMERY, S.; KEEGAN, P.; PAZDUR, R. First FDA approval agnostic of cancer site — When a biomarker defines the indication. **New England Journal of Medicine**, v. 377, n. 15, p. 1409–1412, 2017.

LIGTENBERG, M. J. L. et al. Heritable somatic methylation and inactivation of MSH2 in families with Lynch syndrome due to deletion of the 3' exons of TACSTD1. **Nature Genetics**, v. 41, n. 1, p. 112–117, 2009.

LINCOLN, S. E. et al. A systematic comparison of traditional and multigene panel testing for hereditary breast and ovarian cancer genes in more than 1000 patients. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 17, n. 5, p. 533–544, 2015.

LINDOR, N. M. et al. Lower cancer Incidence in Amsterdam-I Criteria Families Without Mismatch Repair Deficiency: Familial Colorectal Cancer Type X. **Journal of the American Medical Association**, v. 293, n. 16, p. 1979–1985, 2005.

LINDOR, N. M. Familial Colorectal Cancer Type X: The Other Half of Hereditary Nonpolyposis Colon Cancer Syndrome. **Surgical Oncology Clinics of North America**, v. 18, n. 4, p. 637–645, 2009.

LOBO, T. C. **Quanto custa tratar um paciente com câncer no SUS em 2016**. Disponível em: <<https://observatoriodeoncologia.com.br/quanto-custa-tratar-um-paciente-com-cancer-no-sus-em-2016/>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

LOUGHREY, M. B. et al. Incorporation of somatic BRAF mutation testing into an algorithm for the investigation of hereditary non-polyposis colorectal cancer. **Familial Cancer**, v. 6, n. 3, p. 301–310, 2007.

LU, H. M. et al. Association of Breast and Ovarian Cancers with Predisposition Genes Identified by Large-Scale Sequencing. **JAMA Oncology**, v. 5, n. 1, p. 51–57, 2019.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndromes I and II). I. Clinical description of resource. **Cancer**, v. 56, n. 4, p. 934–938, 1985.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary Nonpolyposis Colorectal Carcinoma (HNPCC) and HNPCC-Like Families: Problems in Diagnosis, Surveillance, and Management. **Cancer**, 2004.

LYNCH, H. T. et al. Hereditary colorectal cancer syndromes: Molecular genetics, genetic counseling, diagnosis and management. **Fam Cancer**, v. 7, n. 1, p. 27–39, 2008.

LYNCH, H. T.; DE LA CHAPELLE, A. Hereditary Colorectal Cancer. **The New England Journal of Medicine**, v. 348, n. 10, p. 919–932, 2003.

LYNCH, H. T.; KRUSH, A. J. Cancer family “G” revisited: 1895-1970. **Cancer**, v. 27, n. 6, p. 1505–1511, 1971.

LYNCH, P. M. History of Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer or “Lynch Syndrome”. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 28, n. 4, p. 500–511, 2017.

MACARON, C.; LEACH, B. H.; BURKE, C. A. Hereditary Colorectal cancer syndromes and genetic testing. **Journal of Surgical Oncology**, v. 111, n. 1, p. 103–111, 2015.

MAJUMDER, S. et al. A cancer vaccine approach for personalized treatment of Lynch Syndrome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 12122, 2018.

MARQUEZ, E. et al. Implementation of routine screening for Lynch syndrome in university and safety-net health system settings: Successes and challenges. **Genetics in Medicine**, v. 15, n. 12, p. 925–932, 2013.

MARTINEZ, S. L.; KOLODNER, R. D. Functional analysis of human mismatch repair gene mutations identifies weak alleles and polymorphisms capable of polygenic interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 11, p. 5070–5075, 2010.

MAYO-GAMBLE, T. L.; MOUTON, C. Examining the Association Between Health Literacy and Medication Adherence Among Older Adults. **Health Communication**, v. 33, n. 9, p. 1124–1130, 2017.

MELO, D. G.; SEQUEIROS, J. The challenges of incorporating genetic testing in the Unified National Health System in Brazil. **Genetic Testing and Molecular Biomarkers**, v. 16, n. 7, p. 651–655, 2012.

MENSENKAMP, A. R. et al. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. **Gastroenterology**, v. 146, n. 3, p. 643–646, 2014.

MOJARAD, E. N. et al. Low level of microsatellite instability correlates with poor clinical prognosis in stage II colorectal cancer patients. **Journal of Oncology**, p. Epub 2016 Jun 27, 2016.

MØLLER, P. et al. Cancer incidence and survival in Lynch syndrome patients receiving colonoscopic and gynaecological surveillance: first report from the prospective Lynch syndrome database. **Gut**, v. 66, n. 3, p. 464–472, 2017.

MØLLER, P. et al. Cancer risk and survival in path-MMR carriers by gene and gender up to 75 years of age: A report from the Prospective Lynch Syndrome Database. **Gut**, v. 67, n. 7, p. 1306–1316, 2018.

MONAHAN, K. J. et al. Urgent improvements needed to diagnose and manage Lynch syndrome. **BMJ (Online)**, v. 356, p. j1388, 2017.

MONTEIRO SANTOS, E. M. et al. Predictive models for mutations in mismatch repair genes: Implication for genetic counseling in developing countries. **BMC Cancer**, v. 12, 2012.

MUNDADE, R. et al. Genetic Pathways, Prevention, and Treatment of Sporadic Colorectal Cancer. **Oncoscience**, v. 1, n. 6, p. 400–406, 2014.

MVUNDURA, M. et al. The cost-effectiveness of genetic testing strategies for Lynch syndrome among newly diagnosed patients with colorectal cancer. **Genetics in medicine**, v. 12, n. 2, p. 93–104, 2010.

NCCN, 2019. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Genetic / Familial High-Risk Assessment: Colorectal 2.2019.

NCCN, 2019. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®) Genetic/Familial High-Risk Assessment: Breast, Ovarian and Pancreatic 1.2020.

NCCN, 2019. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®): Soft Tissue Sarcoma 6.2019.

NI, L.; DONG, C. New B7 family checkpoints in human cancers. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 16, n. 7, p. 1203–1211, 2017.

NICOLAIDES, N. C. et al. Genomic organization of the human PMS2 gene family. **Genomics**, v. 30, p. 195–206, 1995.

NIKOLAIDIS, C. et al. Challenges and Opportunities for Cancer Predisposition Cascade Screening for Hereditary Breast and Ovarian Cancer and Lynch Syndrome in Switzerland: Findings from an International Workshop. **Public Health Genomics**, v. 21, n. 3–4, p. 121–132, 2019.

NILBERT, M. et al. Sarcomas associated with hereditary nonpolyposis colorectal cancer: Broad anatomical and morphological spectrum. **Familial Cancer**, v. 8, n. 3, p. 209–213, 2009.

OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man® - An Online Catalog of Human Genes and Genetic Disorders. Disponível em: <<https://omim.org/>>. Acesso em: 4 fev. 2020.

OVERBEEK, L. I. H. et al. Interpretation of immunohistochemistry for mismatch repair proteins is only reliable in a specialized setting. **American Journal of Surgical Pathology**, 2008.

PAGIN, A. et al. Evaluation of a new panel of six mononucleotide repeat markers for the detection of DNA mismatch repair-deficient tumours. **British Journal of Cancer**, v. 108, n. 10, p. 2079–2087, 2013.

PARDOLL, D. M. Spinning molecular immunology into successful immunotherapy. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 4, p. 227–238, 2002.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 12, n. 4, p. 252–64, 2012.

PARRY, S. et al. Metachronous colorectal cancer risk for mismatch repair gene mutation carriers: The advantage of more extensive colon surgery. **Gut**, v. 60, n. 7, p. 950–957, 2011.

PATNAIK, A. et al. Phase I study of MK-3475 (anti-PD-1 monoclonal antibody) in patients with advanced solid tumors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 30, n. 15, p. 2512, 2012.

PAWLIK, T. M.; RAUT, C. P.; RODRIGUEZ-BIGAS, M. A. Colorectal carcinogenesis: MSI-H versus MSI-L. **Disease Markers**, v. 20, n. 4–5, p. 199–206, 2004.

PELTOMÄKI, P. Update on Lynch syndrome genomics. **Familial Cancer**, v. 15, p. 385–393, 2016.

PINHEIRO, M. et al. The nonsense mutation MSH2 c.2152C>T shows a founder effect in Portuguese Lynch syndrome families. **Genes Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 9, p. 657–664, 2019.

PLON, S. E. et al. Sequence variant classification and reporting: recommendations for improving the interpretation of cancer susceptibility genetic test results. **Human Mutation**, v. 29, n. 11, p. 1282–1291, 2008.

PODLAHA, O.; ZHANG, J. Pseudogenes and Their Evolution. In: **Encyclopedia of Life Sciences**. [s.l: s.n.].

RAYMOND, V. M. et al. Adrenocortical carcinoma is a Lynch syndrome-associated cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 31, n. 24, p. 3012–3018, 2013.

RESTA, R. et al. A new definition of genetic counseling: National Society of Genetic Counselors' Task Force report. **Journal of Genetic Counseling**, v. 15, n. 2, p. 77–83, 2006.

RICHARDS, S. et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. **Genetics in Medicine**, 2015.

ROBERT, C.; SORIA, J.-C.; EGGERMONT, A. M. M. Drug of the year: Programmed Death-1 receptor/Programmed Death-1 Ligand-1 receptor monoclonal antibodies. **European Journal of Cancer**, v. 49, n. 14, p. 2968–2971, 2013.

ROBERTS, M. E. et al. MSH6 and PMS2 germ-line pathogenic variants implicated in Lynch syndrome are associated with breast cancer. **Genetics in Medicine**, v. 20, n. 10, p. 1167–1174, 2018.

RODRÍGUEZ-SOLER, M. et al. Risk of cancer in cases of suspected Lynch syndrome without germline mutation. **Gastroenterology**, v. 144, p. 926–932, 2013.

ROHLIN, A. et al. Expanding the genotype–phenotype spectrum in hereditary colorectal cancer by gene panel testing. **Familial Cancer**, v. 16, n. 2, p. 195–203, 2017.

ROSENTHAL, E. T. et al. Clinical testing with a panel of 25 genes associated with increased cancer risk results in a significant increase in clinically significant findings across a broad range of cancer histories. **Cancer Genetics**, v. 218–219, p. 58–68, 2017.

ROSSI, B. M. et al. hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Annals of Surgical Oncology**, v. 9, n. 6, p. 555–561, 2002.

ROSSI, B. M. et al. The Development of the Study of Hereditary Cancer in South America. **Genetics and Molecular Biology**, v. 39, n. 2, p. 166–167, 2016.

ROSSI, B. M. et al. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America. **BMC Cancer**, v. 17, n. 1, p. 1–26, 2017.

ROSTY, C. et al. Germline mutations in PMS2 and MLH1 in individuals with solitary loss of PMS2 expression in colorectal carcinomas from the colon cancer family registry cohort. **BMJ Open**, v. 6, n. 2, p. e010293, 2016.

RUMILLA, K. et al. Frequency of deletions of EPCAM (TACSTD1) in MSH2-associated Lynch syndrome cases. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 13, n. 1, p. 93–99, 2011.

RUTTER, C. M. et al. Validation of Models used to Inform Colorectal Cancer Screening Guidelines: Accuracy and Implications. **Medical Decision Making**, v. 36, n. 5, p. 604–614, 2015.

SCHILDBERG, F. A. et al. Coinhibitory Pathways in the B7-CD28 Ligand-Receptor Family. **Immunity**, v. 44, n. 5, p. 955–972, 2016.

SCHNEIDER, N. B. et al. Germline MLH1, MSH2 and MSH6 variants in Brazilian patients with colorectal cancer and clinical features suggestive of Lynch Syndrome. **Cancer Medicine**, v. 7, n. 5, p. 2078–2088, 2018.

SEHGAL, R. et al. Lynch Syndrome: An updated review. **Genes**, v. 5, n. 3, p. 497–507, 2014.

SENER, L. et al. The Clinical Phenotype of Lynch Syndrome Due to Germ-Line PMS2 Mutations. **Gastroenterology**, v. 135, n. 2, p. 419–428, 2008.

SHAIKH, T. et al. Mismatch repair deficiency testing in patients with colorectal cancer and nonadherence to testing guidelines in young adults. **JAMA Oncology**, v. 4, n. 2, p. Epub 2018 Feb 8, 2018.

SHARAF, R. N. et al. Uptake of Genetic Testing by Relatives of Lynch Syndrome Probands: A Systematic Review. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 9, p. 1093–1100, 2013.

SHIA, J. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: Part I. The utility of immunohistochemistry. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 293–300, 2008.

SIJMONS, R. H.; GREENBLATT, M. S.; GENUARDI, M. Gene variants of unknown clinical significance in Lynch syndrome. An introduction for clinicians. **Familial Cancer**, v. 12, n. 2, p. 181–187, 2013.

SILVA, F. C. C. et al. Germline Mutations in MLH1 Leading to Isolated Loss of PMS2 Expression in Lynch Syndrome [Letter to the Editor]. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 41, n. 6, p. 861–864, 2017.

SINGH, H. et al. Underdiagnosis of Lynch Syndrome Involves More Than Family History Criteria. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 8, n. 6, p. 523–529, 2010.

SMITH, M. J. et al. The Contribution of Whole Gene Deletions and Large Rearrangements to the Mutation Spectrum in Inherited Tumor Predisposing Syndromes. **Human Mutation**, v. 37, n. 3, p. 250–256, 2016.

SNOVER, D. C. et al. Serrated polyps of the colon and rectum and serrated (“hyperplastic”) polyposis. In: BOSMAN ST, CARNEIRO F, HRUBAN RH, T. N. (Ed.). **WHO Classification of Tumours of the Digestive System**. 4th. ed. Berlin: Springer-Verlag, 2010.

SOURROUILLE, I. et al. Somatic mosaicism and double somatic hits can lead to MSI colorectal tumors. **Familial Cancer**, v. 12, n. 1, p. 27–33, 2013.

STEELE, S. et al. **The ASCRS Textbook of Colon and Rectal Surgery**. 3rd. ed. Chicago: Springer International Publishing, 2016.

SYNGAL, S. et al. Sensitivity and specificity of clinical criteria for hereditary non-polyposis colorectal cancer associated mutations in MSH2 and MLH1. **Journal of Medical Genetics**, v. 37, n. 9, p. 641–645, 2000.

SYNGAL, S. et al. ACG clinical guideline: Genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. **American Journal of Gastroenterology**, v. 110, n. 2, p. 223–262, 2015.

TEN BROEKE, S. W. et al. Cancer Risks for PMS2 -Associated Lynch Syndrome. **Journal of Clinical Oncology**, v. 36, n. 29, p. 2961–2968, 2018.

TERDIMAN, J. P. et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in young colorectal cancer patients: High-risk clinic versus population-based registry. **Gastroenterology**, v. 122, n. 4, p. 940–947, 2002.

TLEMSANI, C. et al. Chemoresistant pleomorphic rhabdomyosarcoma: Whole exome sequencing reveals underlying cancer predisposition and therapeutic options. **Journal of Medical Genetics**, v. 0, p. 1–5, 2018.

TOMLINSON, I. et al. Does MSI-low exist? **Journal of Pathology**, v. 197, n. 1, p. 6–13, 2002.

TOPALIAN, S. L. et al. Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 366, n. 26, p. 2443–2454, 2012.

UMAR, A. et al. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 96, n. 4, p. 261–268, 2004.

VALENTIN, M. D. et al. Characterization of germline mutations of MLH1 and MSH2 in unrelated south American suspected Lynch syndrome individuals. **Familial Cancer**, v. 10, n. 4, p. 641–647, 2011.

VALLE, L. Recent Discoveries in the Genetics of Familial Colorectal Cancer and Polyposis. **Clinical Gastroenterology and Hepatology**, v. 15, n. 6, p. 809–819, 2017.

VALLE, L. et al. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. **Journal of Pathology**, v. 247, n. 5, p. 574–588, 2019.

VASEN, H. F. A. et al. The International Collaborative Group on Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). **Diseases of the Colon & Rectum**, v. 34, n. 5, p. 424–425, 1991.

VASEN, H. F. A. et al. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative Group on HNPCC. **Gastroenterology**, v. 116, n. 6, p. 1453–1456, 1999.

VASEN, H. F. A. et al. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): Recommendations by a group of European experts. **Gut**, v. 62, n. 6, p. 812–823, 2013.

VAUGHN, C. P. et al. Clinical analysis of PMS2: Mutation detection and avoidance of pseudogenes. **Human Mutation**, v. 31, n. 5, p. 588–593, 2010.

VAUGHN, C. P. et al. Avoidance of pseudogene interference in the detection of 3' deletions in PMS2. **Human Mutation**, v. 32, n. 9, p. 1063–1071, 2011.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K. W. The path to cancer - Three strikes and you're out. **New England Journal of Medicine**, v. 373, n. 20, p. 1895–1898, 2015.

VON KNEBEL DOEBERITZ, M.; KLOOR, M. Towards a vaccine to prevent cancer in Lynch syndrome patients. **Familial Cancer**, v. 12, n. 2, p. 307–312, 2013.

WANG, W. et al. Molecular subtyping of colorectal cancer: Recent progress, new challenges and emerging opportunities. **Seminars in Cancer Biology**, v. 55, p. 37–52, 2019.

WARTHIN, A. S. HEREDITY WITH REFERENCE TO CARCINOMA. **Archives of Internal Medicine**, 1913.

WEINBERG, R. A. **Biology of the Cancer**. 2nd. ed. [s.l.] Garland Science, 2014.

WEISENBERGER, D. J. et al. CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. **Nature Genetics**, v. 38, n. 7, p. 787–793, 2006.

WEISSMAN, S. M. et al. Genetic counseling considerations in the evaluation of families for Lynch Syndrome - A review. **Journal of Genetic Counseling**, v. 20, n. 1, p. 5–19, 2011.

WETTERSTRAND, K. **DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP)**. Disponível em: <www.genome.gov/sequencingcostsdata>. Acesso em: 9 set. 2019.

WHEELER, J. M. D. Epigenetics, mismatch repair genes and colorectal cancer. **Annals of the Royal College of Surgeons of England**, v. 87, n. 1, p. 15–20, 2005.

WILLIS, J. A. et al. Immune Activation in Mismatch Repair–Deficient Carcinogenesis: More Than Just Mutational Rate. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 1, p. 11–17, 2020.

WIMMER, KATHARINA et al. Diagnostic criteria for constitutional mismatch repair deficiency syndrome: Suggestions of the European consortium “Care for CMMRD” (C4CMMRD). **Journal of Medical Genetics**, v. 51, n. 6, p. 355–365, 2014.

WIN, A. K. et al. Risks of primary extracolonic cancers following colorectal cancer in lynch syndrome. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 104, n. 18, p. 1363–1372, 2012.

WIN, A. K. et al. Role of tumour molecular and pathology features to estimate colorectal cancer risk for first-degree relatives. **Gut**, v. 64, n. 1, p. 101–110, 2015.

WIN, A. K. et al. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. **Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention**, v. 26, n. 3, p. 404–412, 2017.

WINAWER, S. J. et al. Prevention of Colorectal Cancer by Colonoscopic Polypectomy. **New England Journal of Medicine**, 1993.

WU, Y. et al. A role for MLH3 in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. **Nature Genetics**, v. 29, n. 2, p. 137–138, 2001.

XAVIER, A. et al. Comprehensive mismatch repair gene panel identifies variants in patients with Lynch-like syndrome. **Molecular Genetics and Genomic Medicine**, v. 7, n. 8, p. e850, 2019.

YAMAMOTO, H.; IMAI, K. Microsatellite instability: an update. **Archives of Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 899–921, 2015.

YOU, J. F. et al. Tumours with loss of MSH6 expression are MSI-H when screened with a pentaplex of five mononucleotide repeats. **British Journal of Cancer**, 2010.

YURGELUN, M. B. et al. Identification of a Variety of Mutations in Cancer Predisposition Genes in Patients with Suspected Lynch Syndrome. **Gastroenterology**, v. 149, n. 3, p. 604–613, 2015.

YURGELUN, M. B.; HAMPEL, H. Recent Advances in Lynch Syndrome: Diagnosis, Treatment, and Cancer Prevention. **American Society of Clinical Oncology Educational Book**, v. 38, p. 101–109, 2018.

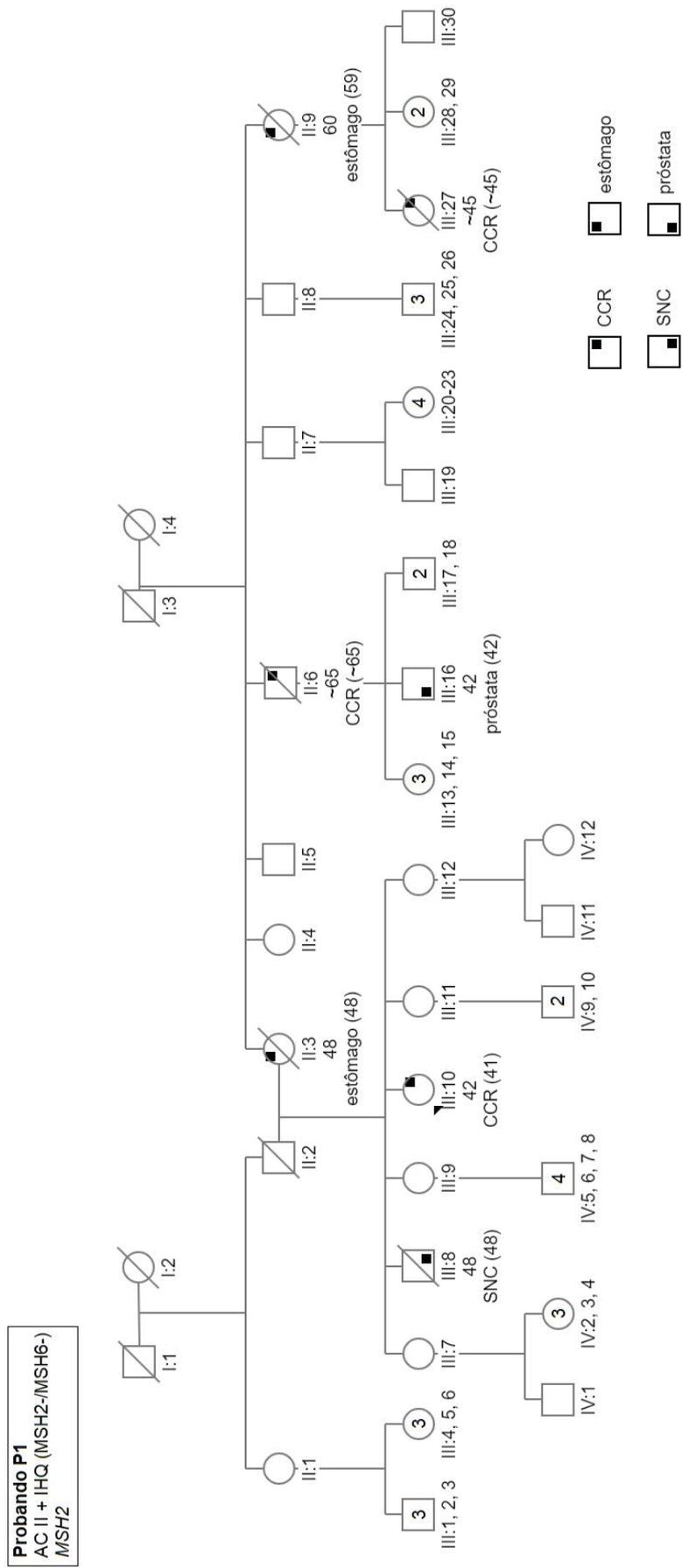
YURGELUN, M. B.; KASTRINOS, F. Tumor testing for microsatellite instability to identify Lynch syndrome: New insights into an old diagnostic strategy. **Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 4, p. 263–265, 2019.

ZHANG, L. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing for screening colorectal cancer patients at risk for hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: Part II. The utility of microsatellite instability testing. **Journal of Molecular Diagnostics**, v. 10, n. 4, p. 301–307, 2008.

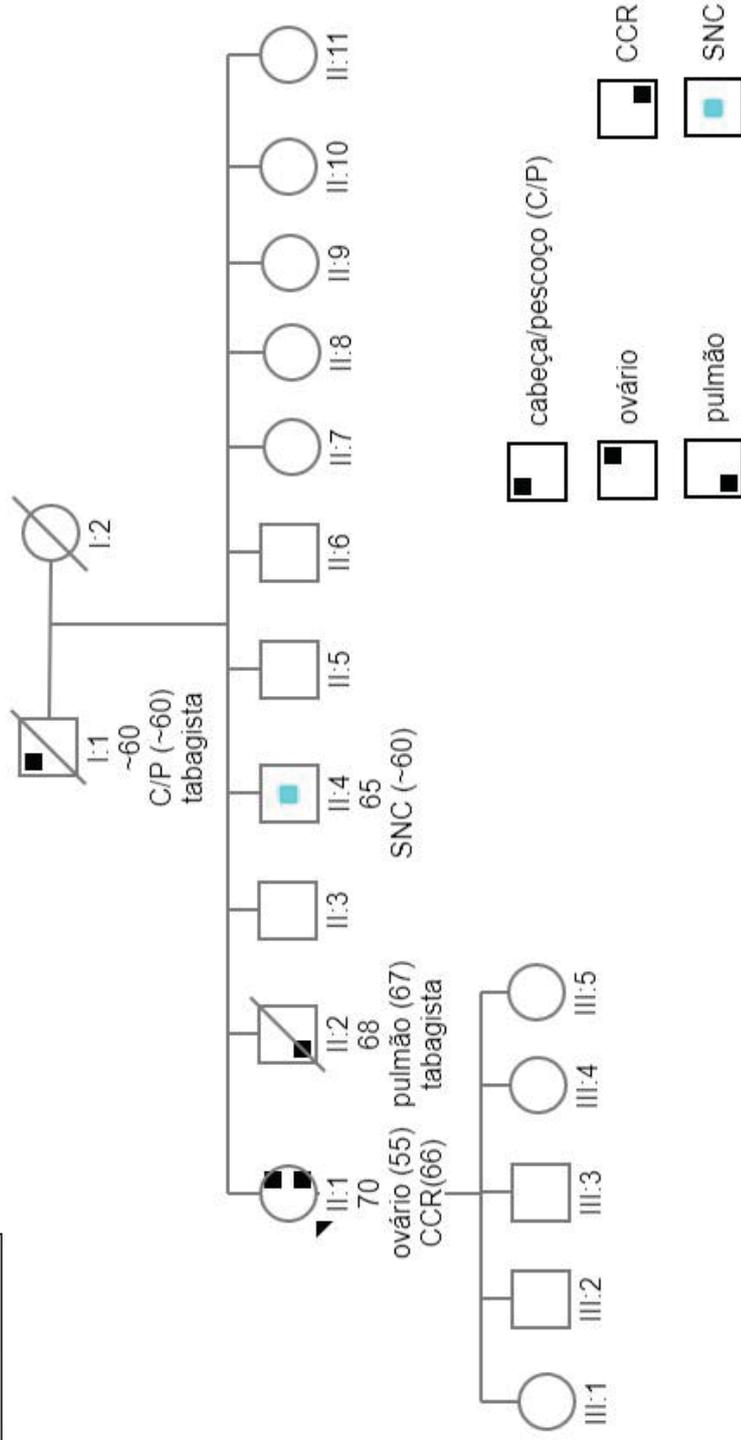
ZHONG, A. et al. Ethical, social, and cultural issues related to clinical genetic testing and counseling in low- and middle-income countries: a systematic review. **Genetics in Medicine**, p. [Epub ahead of print], 2018.

ZOU, W.; CHEN, L. Inhibitory B7-family molecules in the tumour microenvironment. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 6, p. 467–477, 2008.

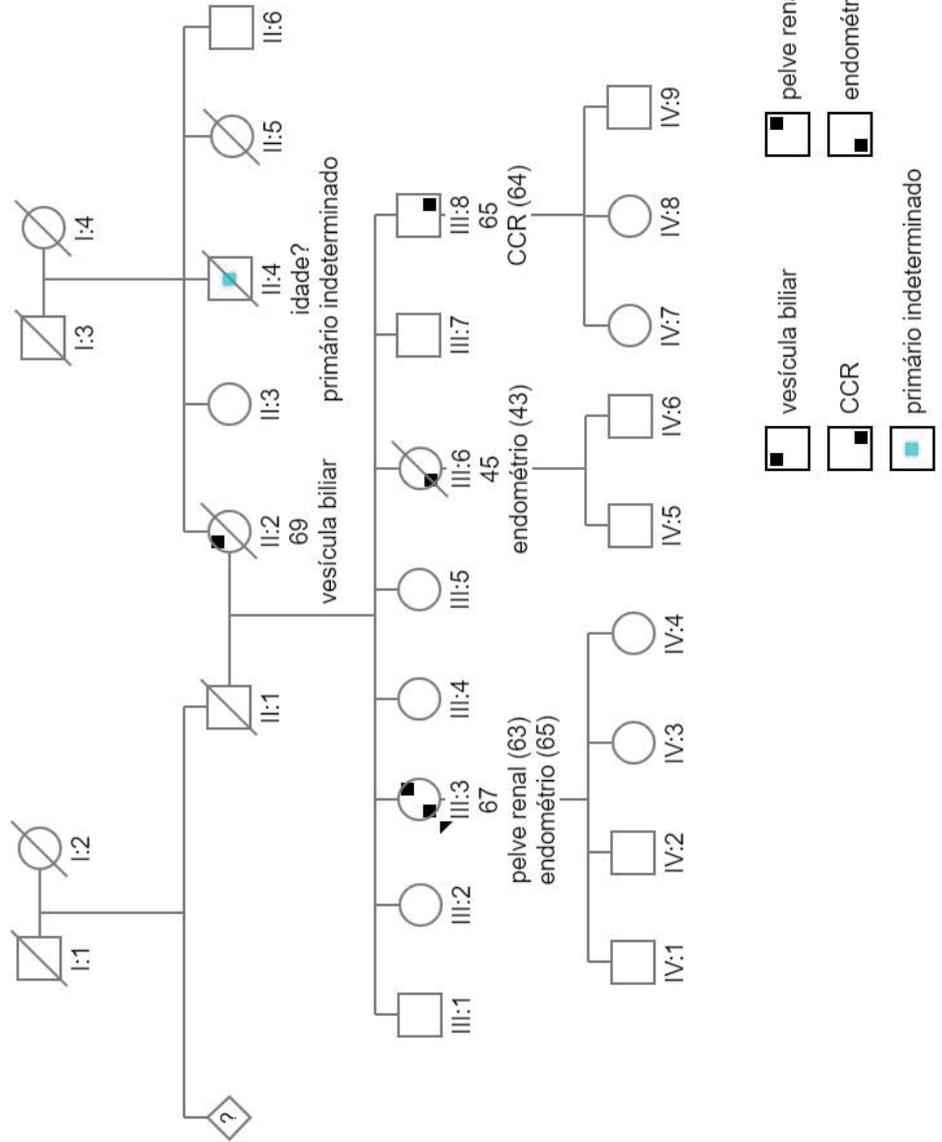
APÉNDICE 1 – HEREDOGRAMAS



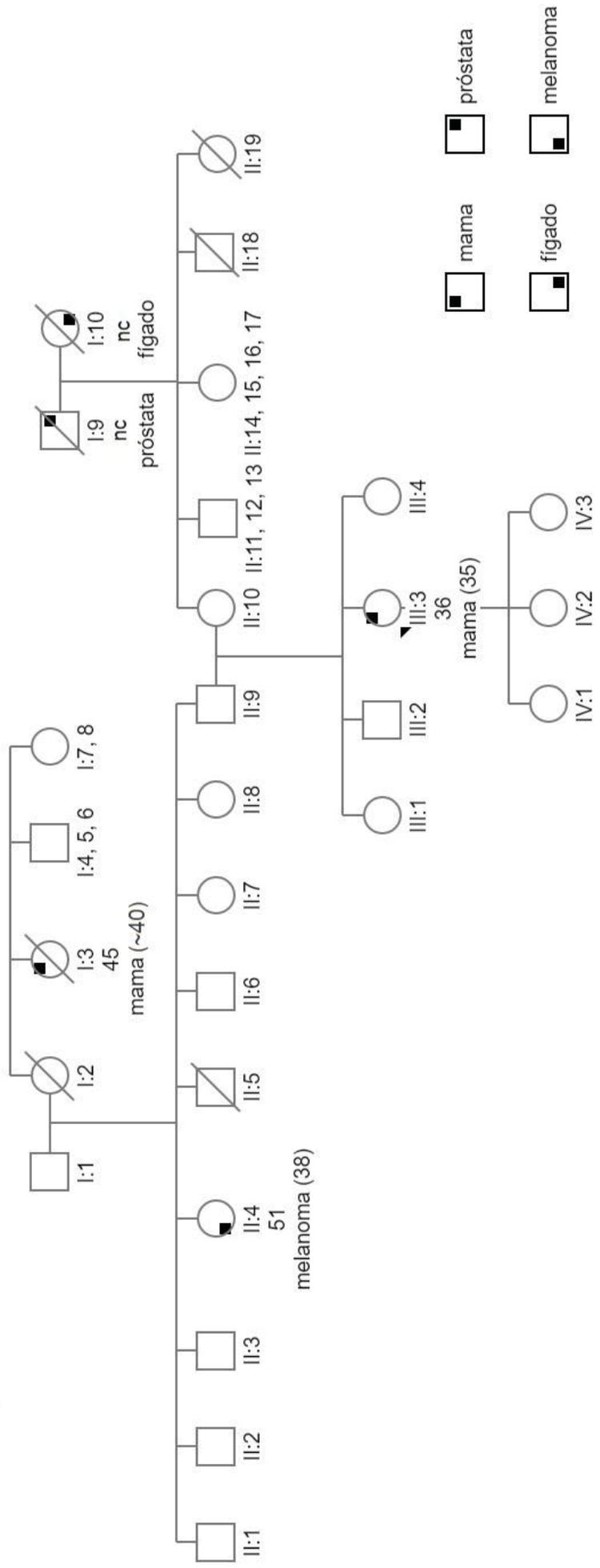
Probando P2
IHQ (PMS2-)
PMS2



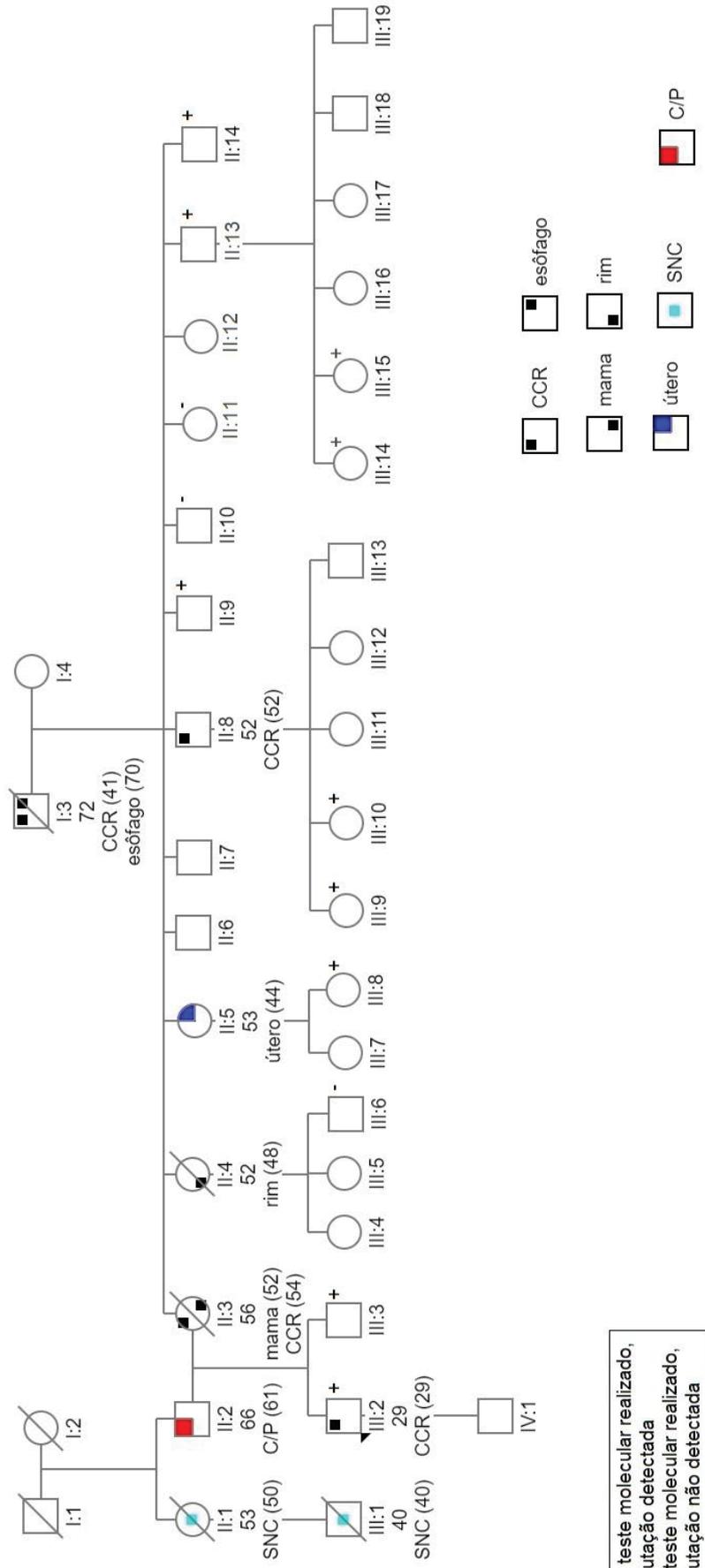
Probando P3
 Teste genético
 MSH2:c.2152C>T



Probando P4
 Teste genético
 MSH6:c.2931C>A

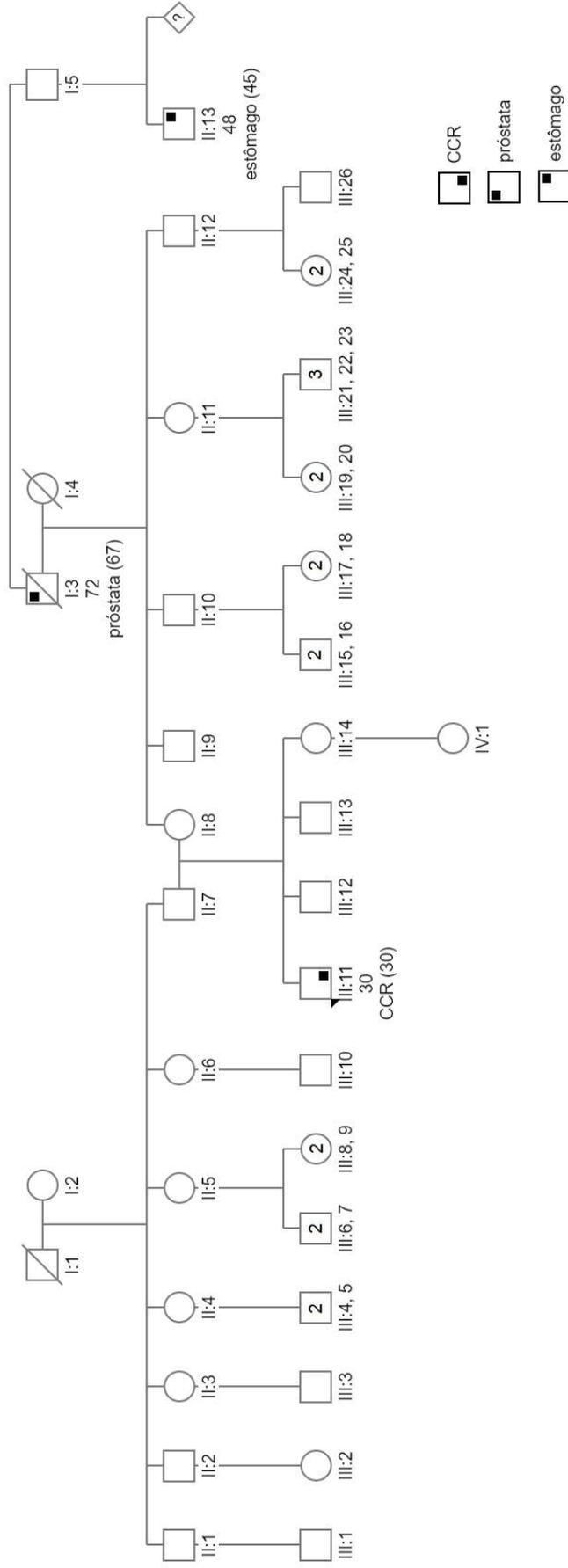


Probando P5
 Teste genético
 MSH2:c.2152C>T

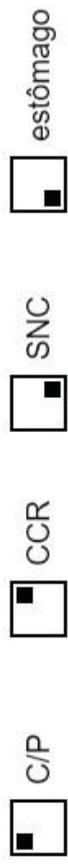
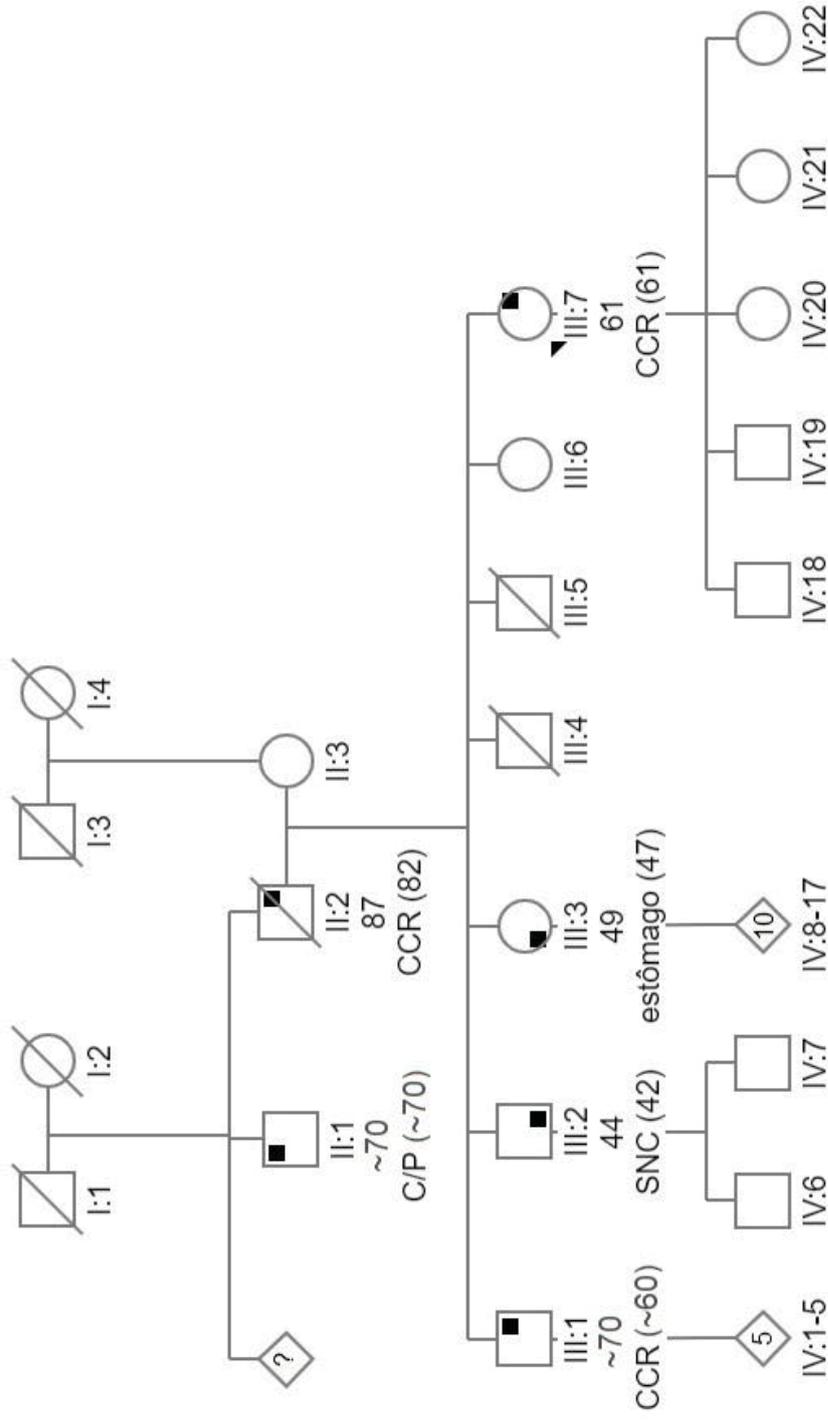


+ : teste molecular realizado,
 mutação detectada
 - : teste molecular realizado,
 mutação não detectada

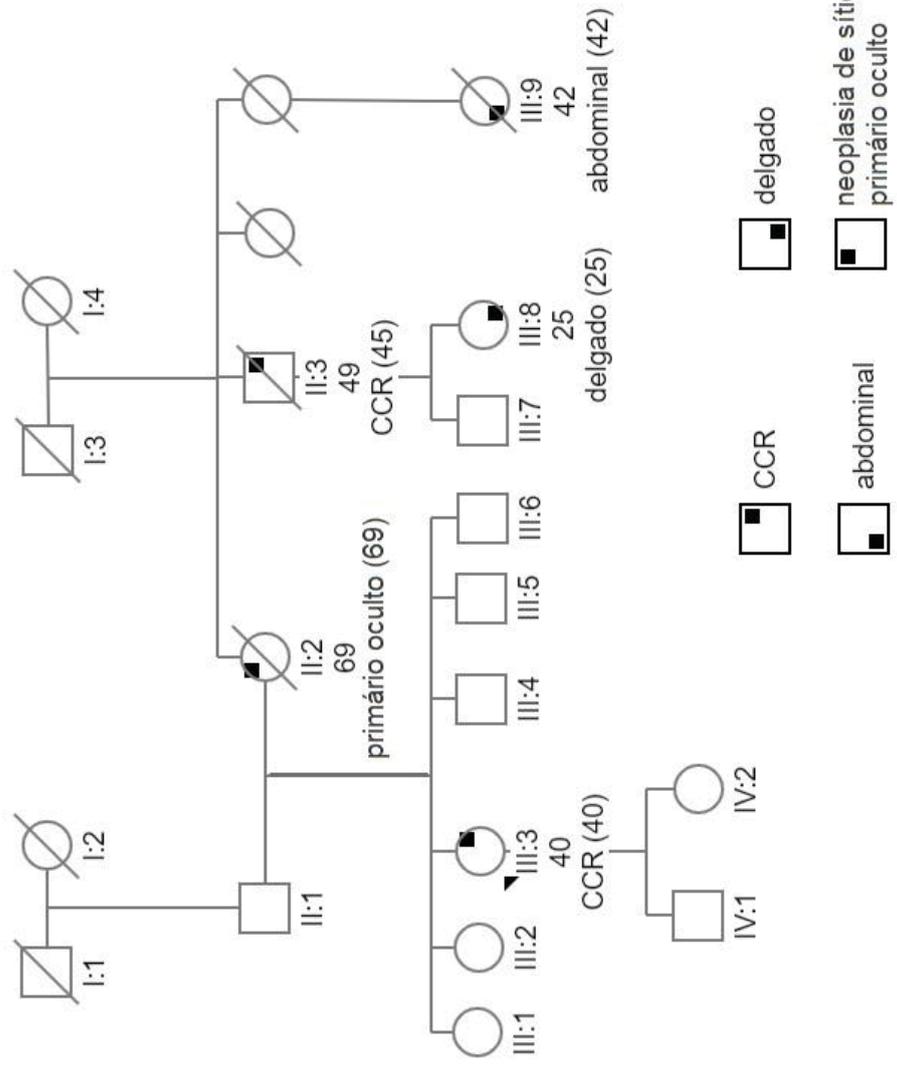
Probando P6
IHQ (PMS2-)
PMS2



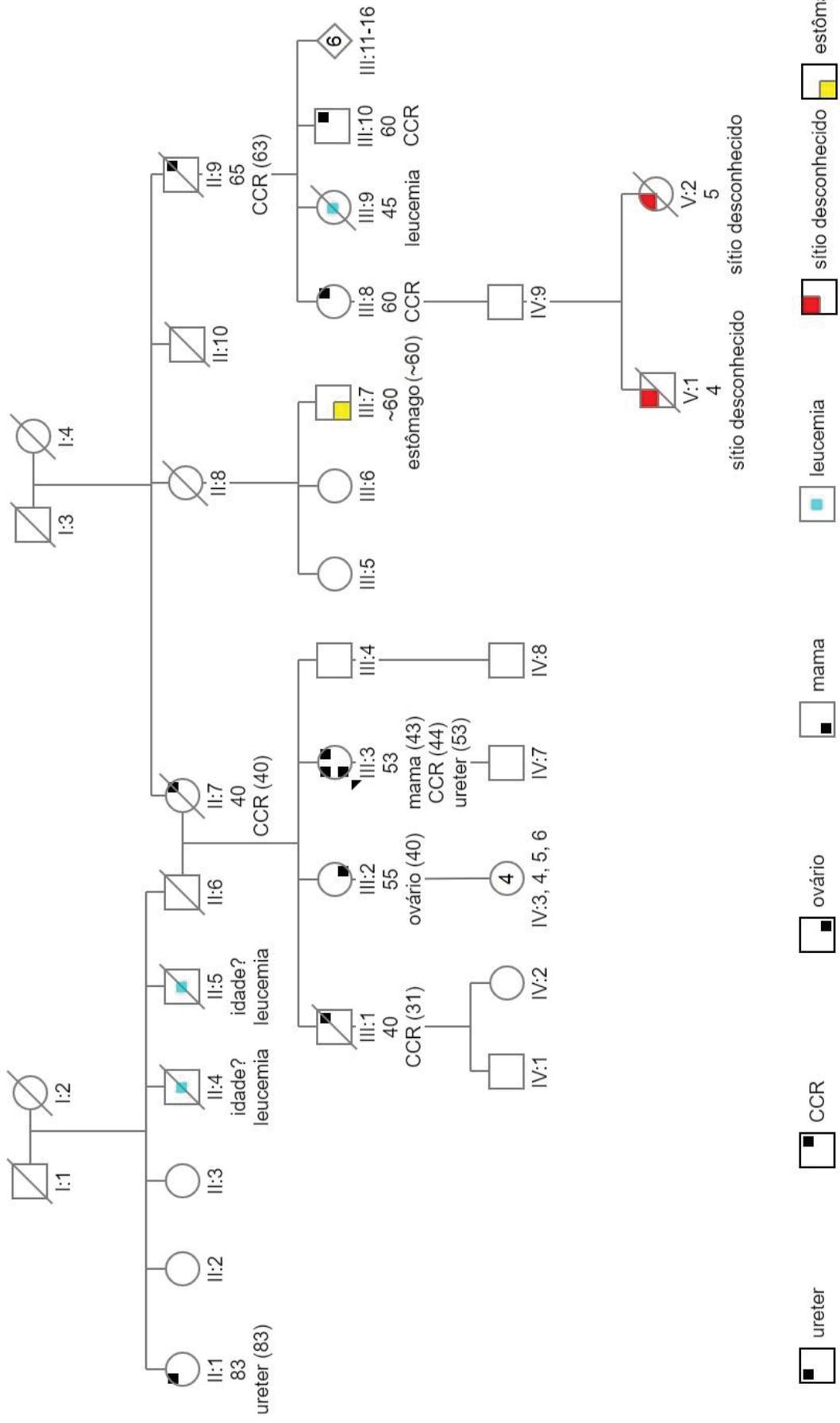
Probando P7
AC II + IHQ
(MLH1-/PMS2-/MSH6-)
MLH1



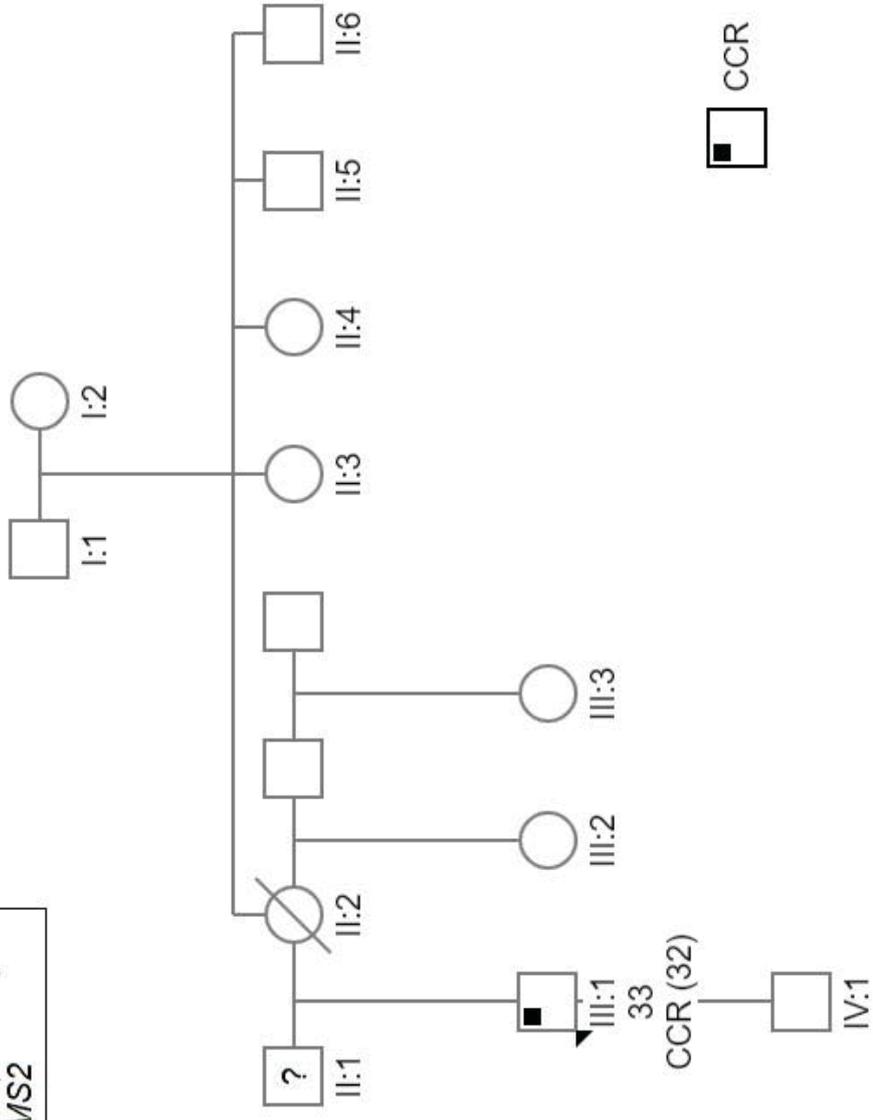
Probando P8
 AC II + IHQ (MLH1-/PMS2-)
 MLH1



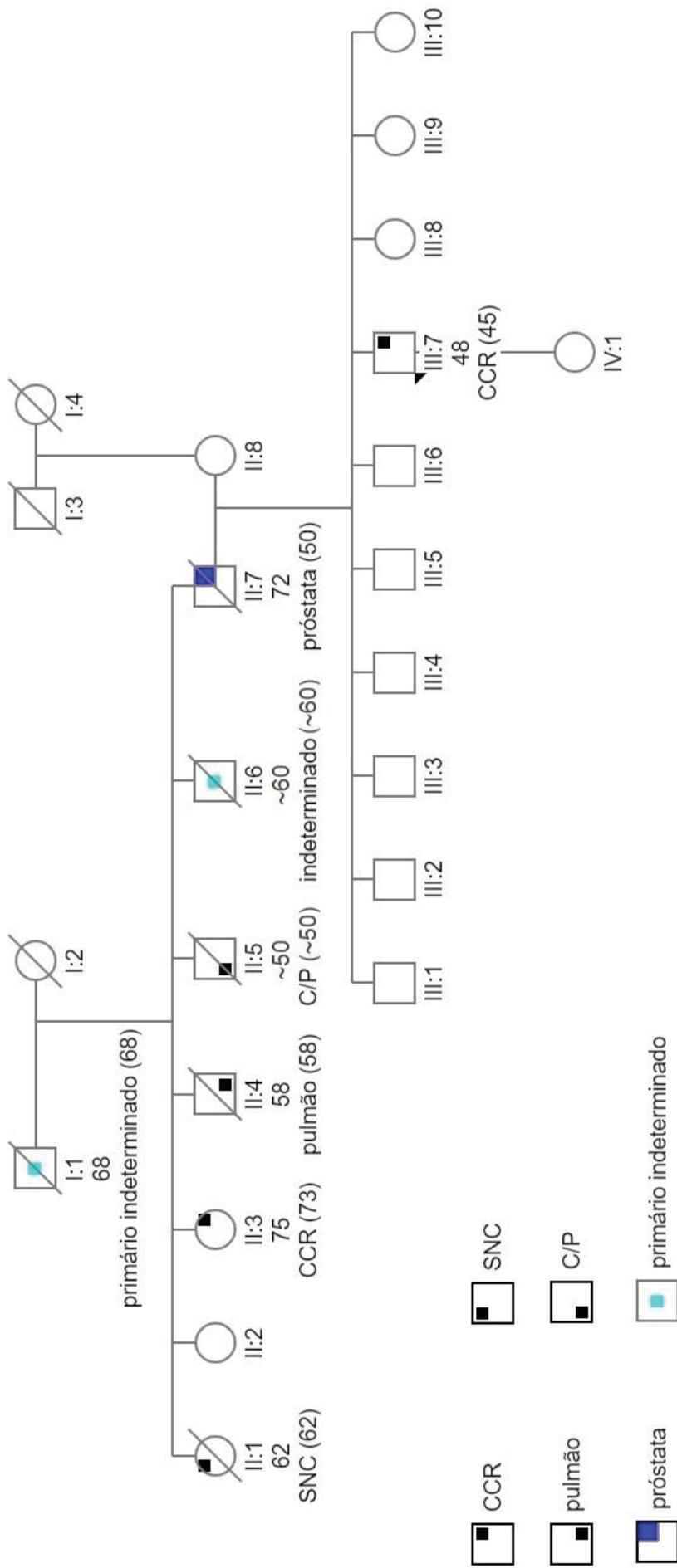
Probando P10
 Teste genético
 MSH2:c.2152C>T



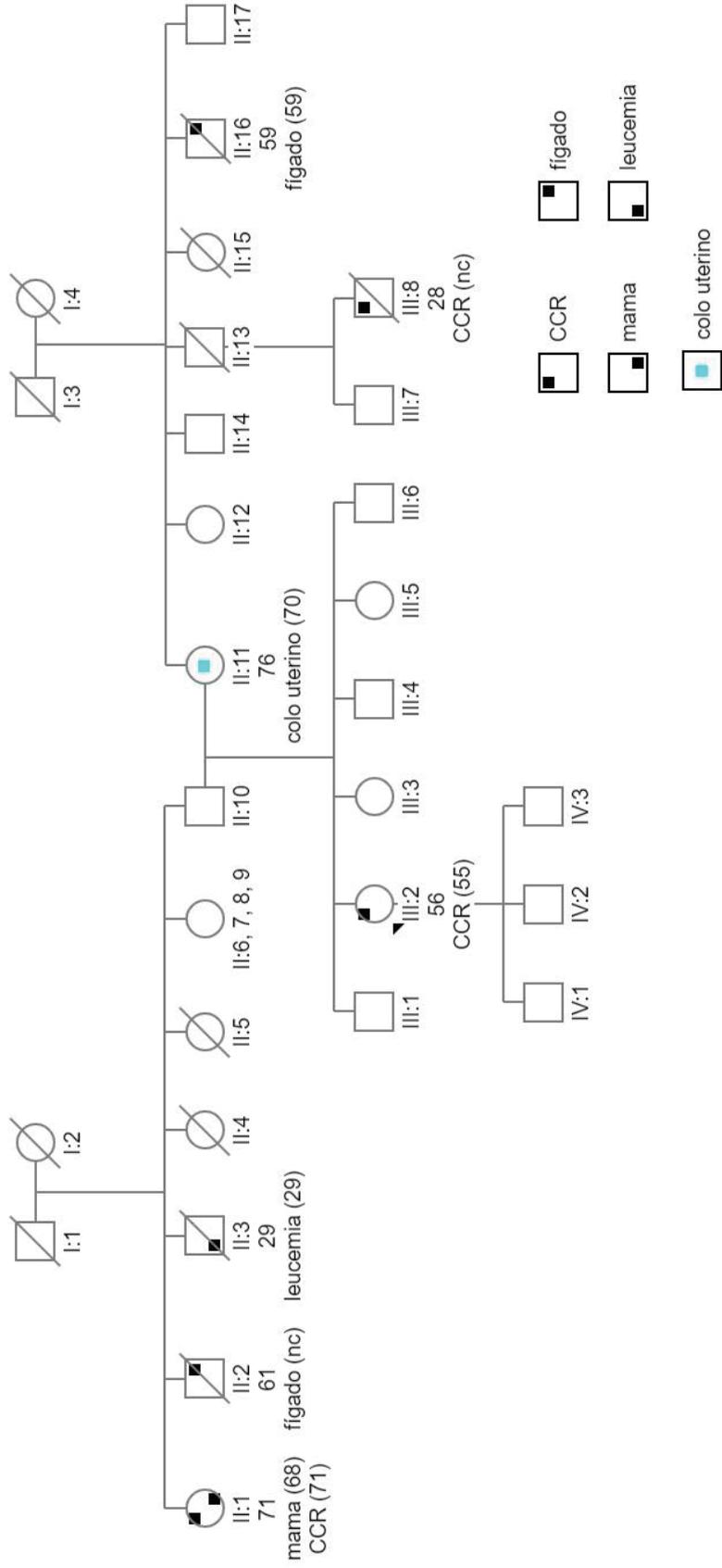
Probando P12
IHQ (PMS2-)
PMS2



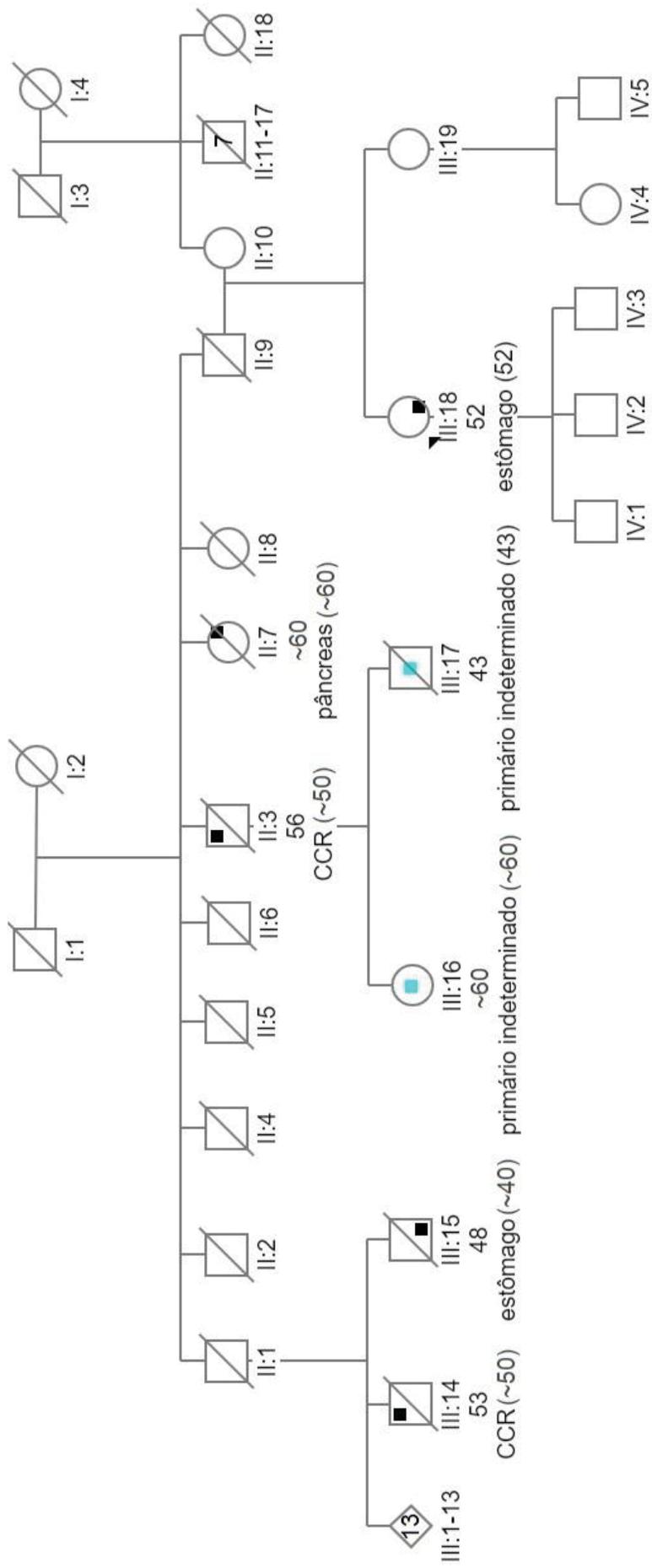
Probando P13
Bethesda + IHQ (MLH1-/PMS2-)
MLH1



Probanda P14
 IHQ (MSH6-)
 MSH6

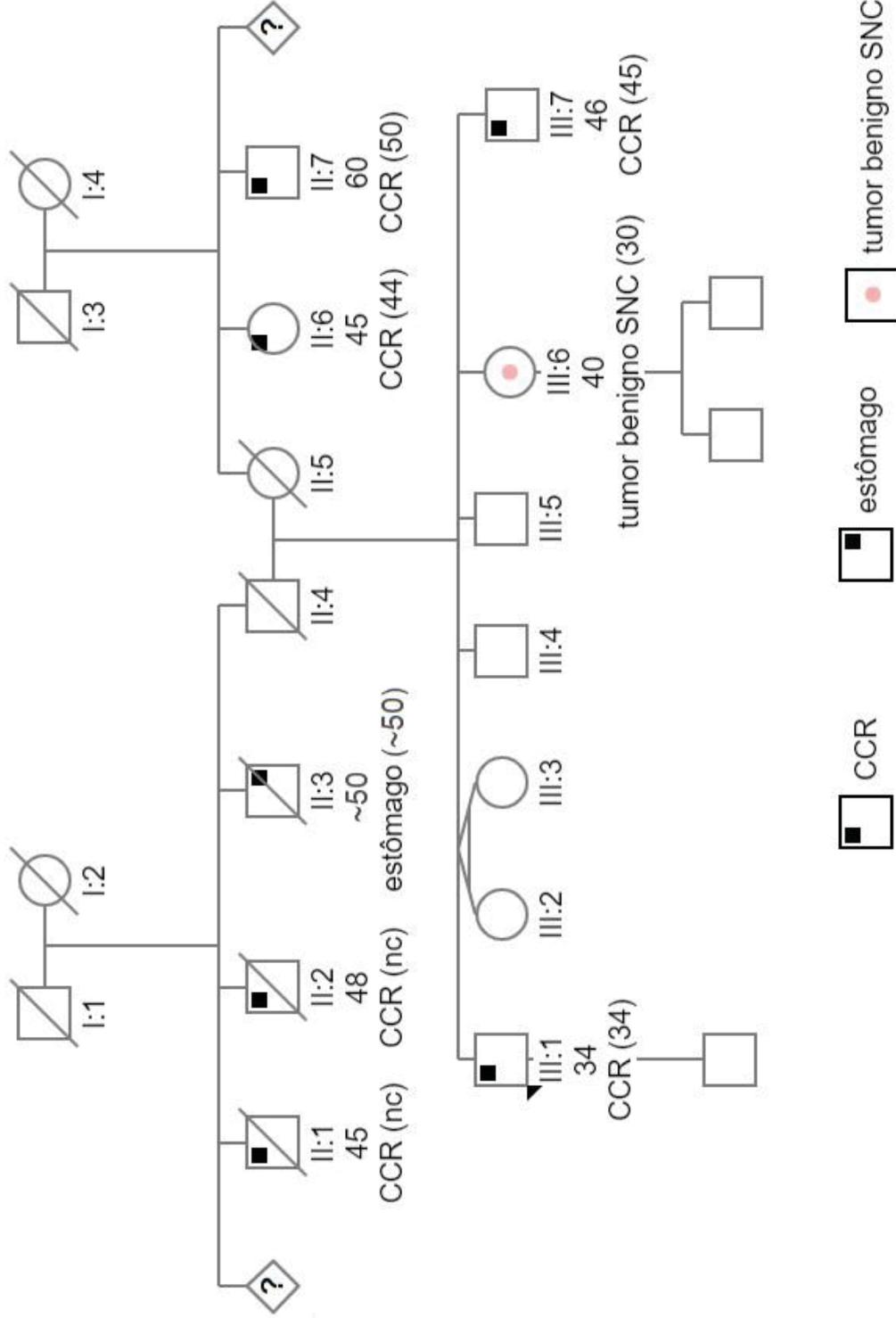


Probando P17
IHQ (PMS2-)
PMS2

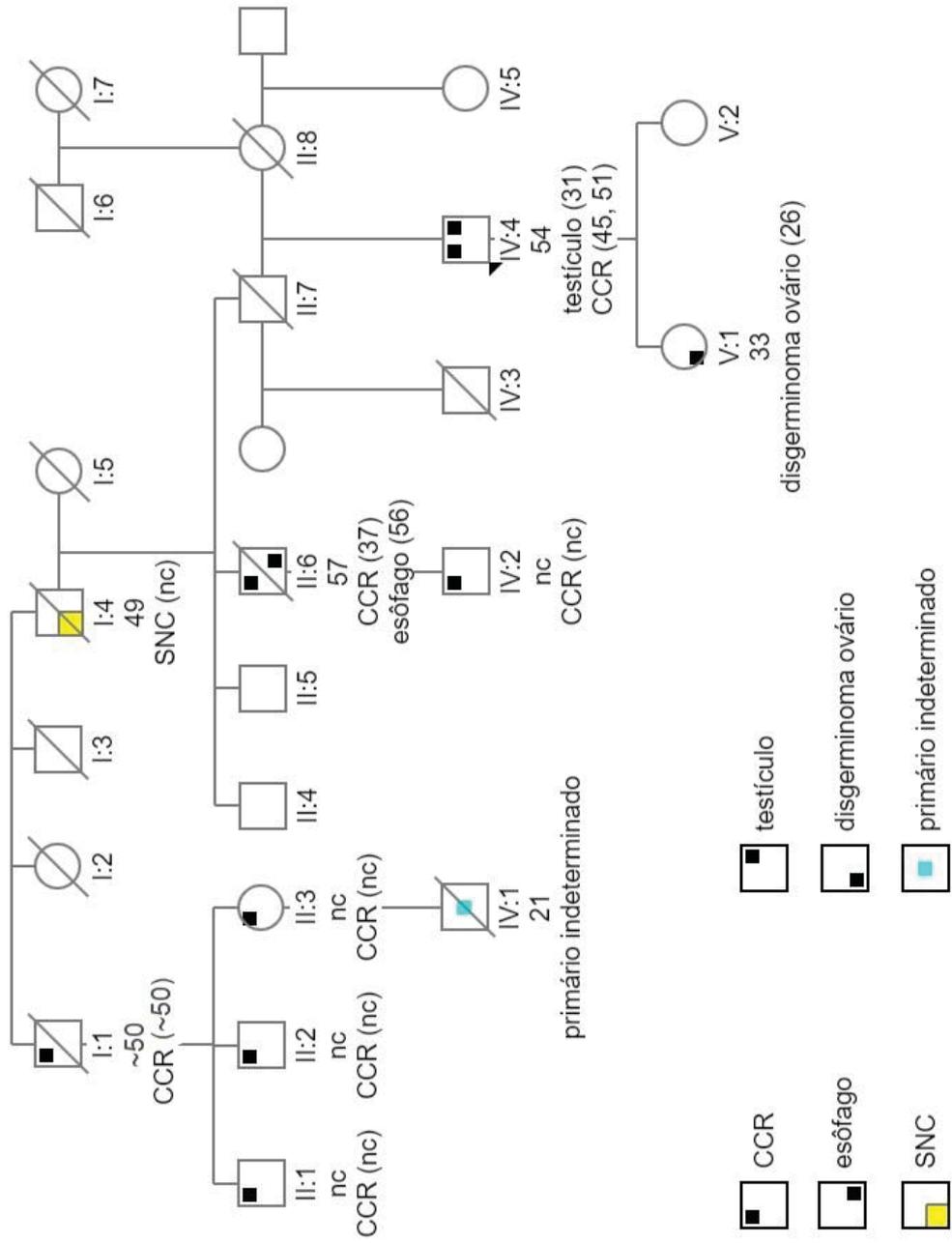


 CCR
 pâncreas
 estômago
 primário indeterminado

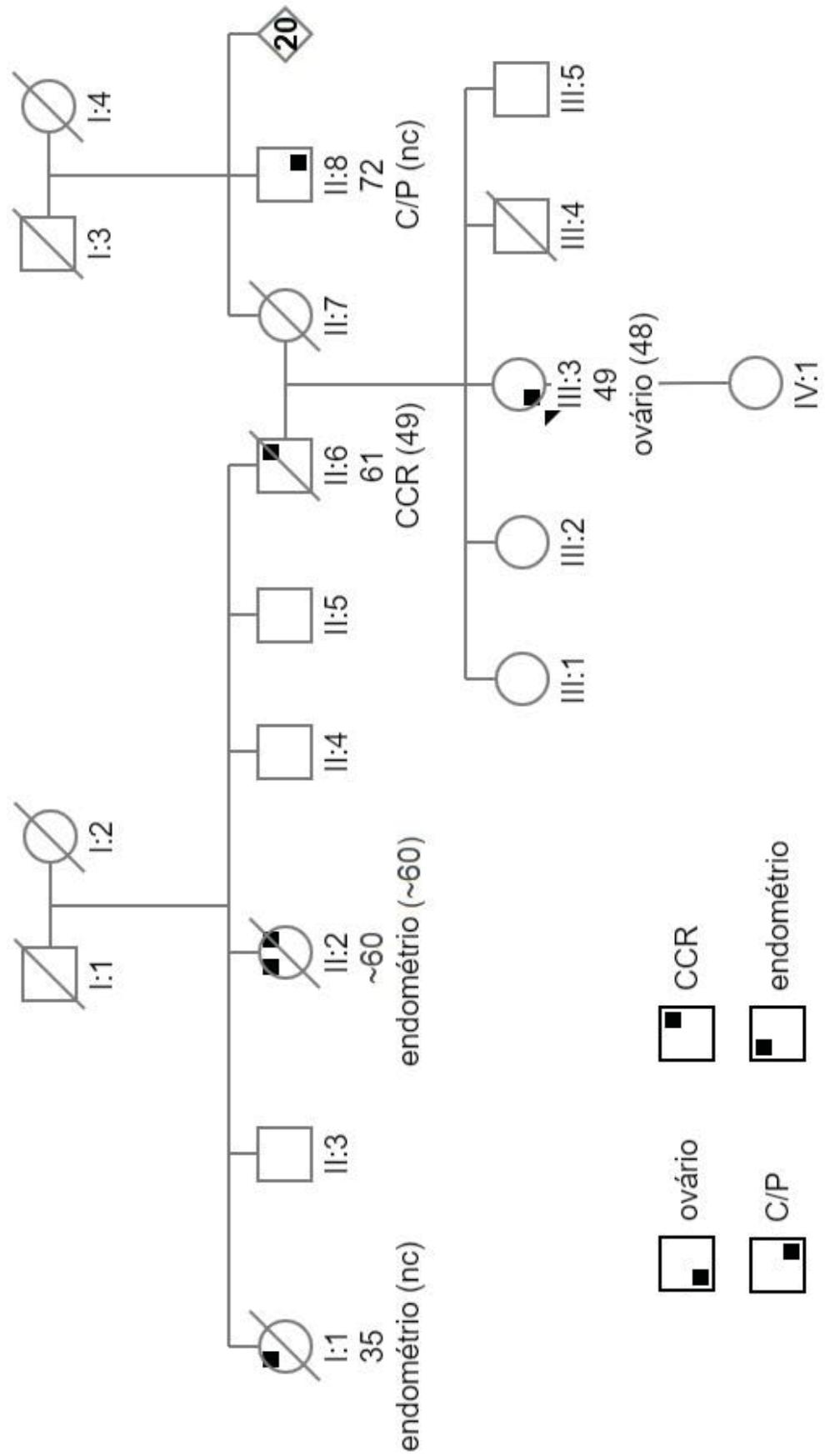
Probando P18
 IHQ (PMS2-)
 PMS2



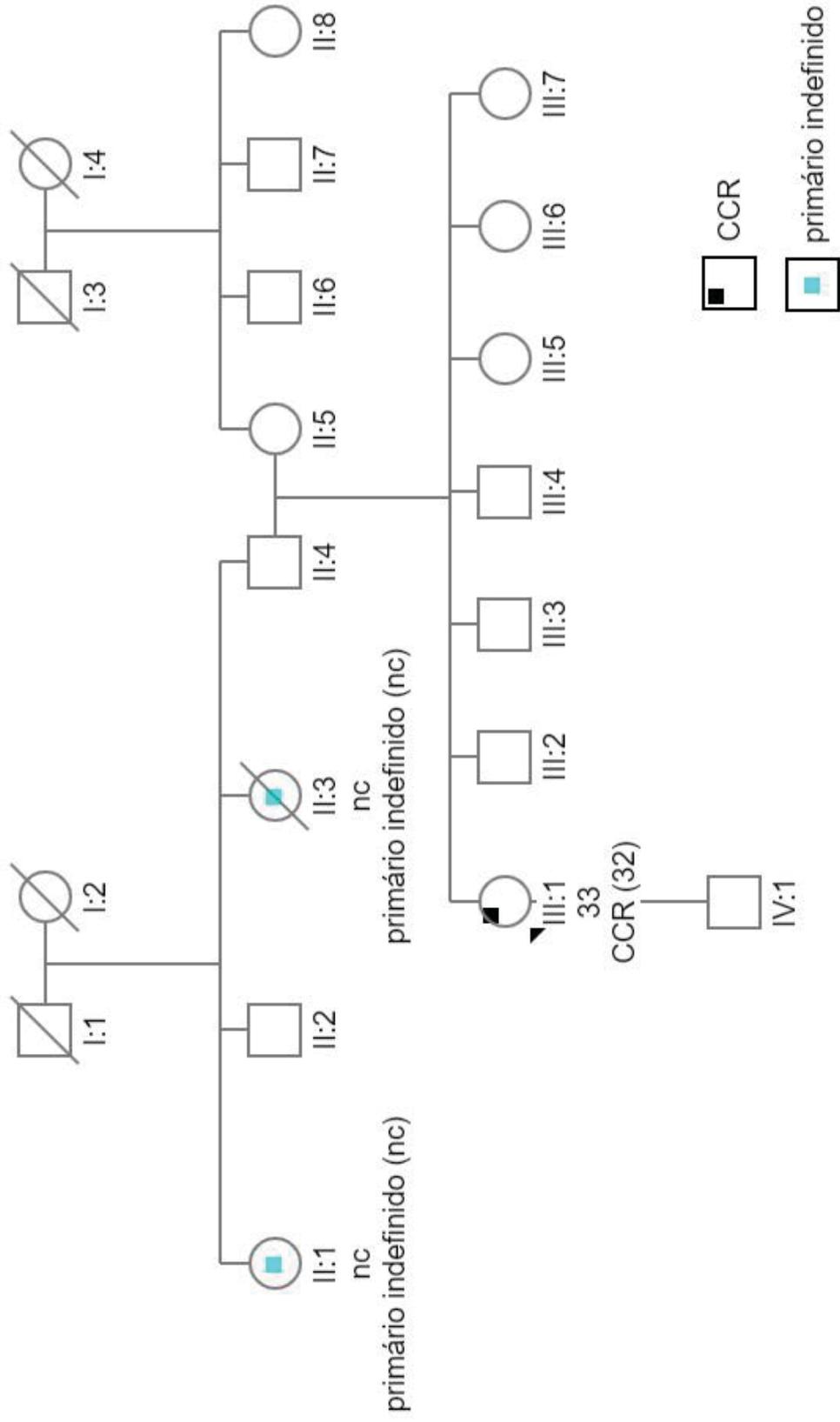
Probando P20
 Teste genético
 MSH2:c.2271C>G



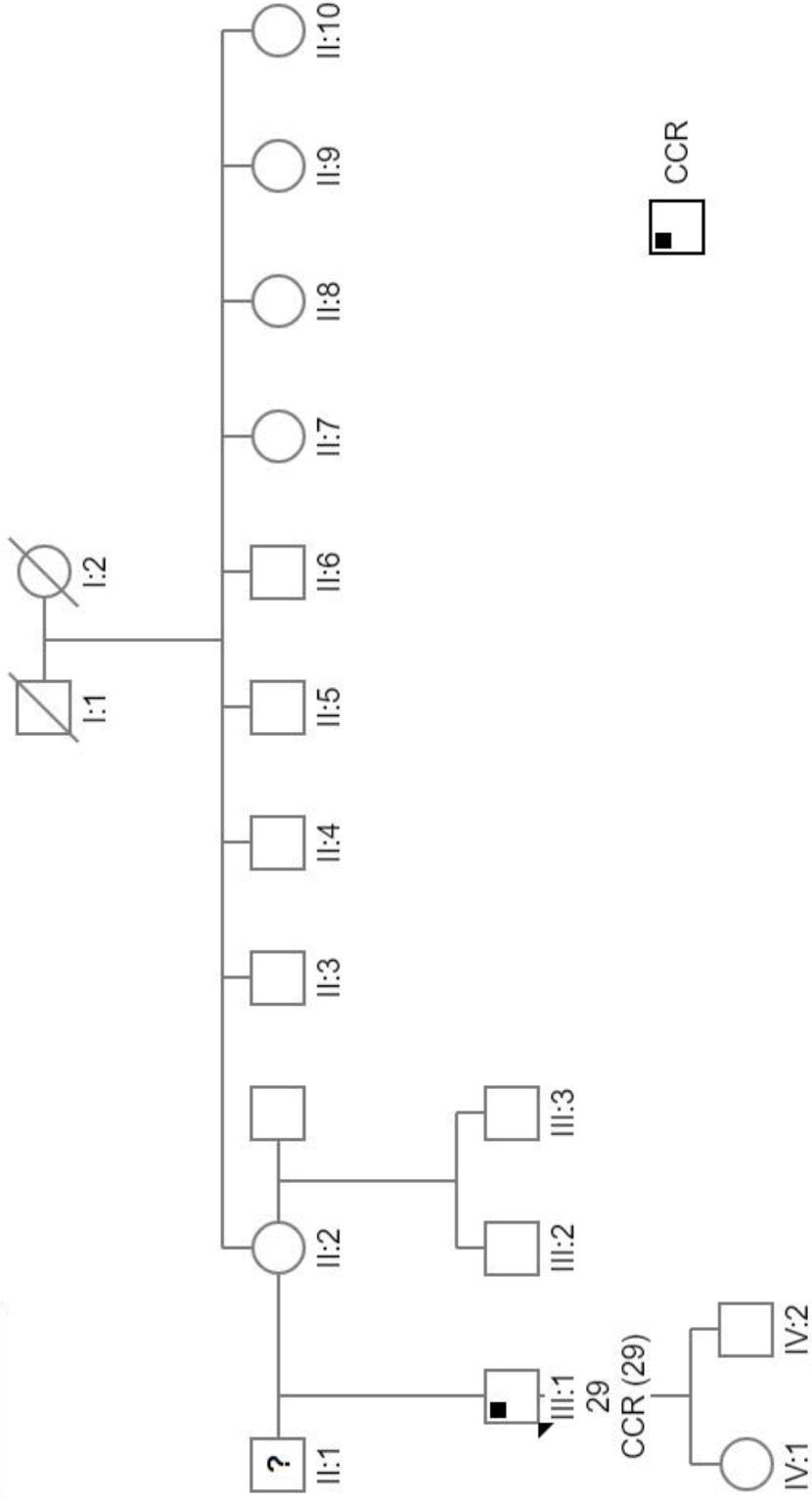
Probando P21
 AC II + IHQ (PMS2-)
 PMS2



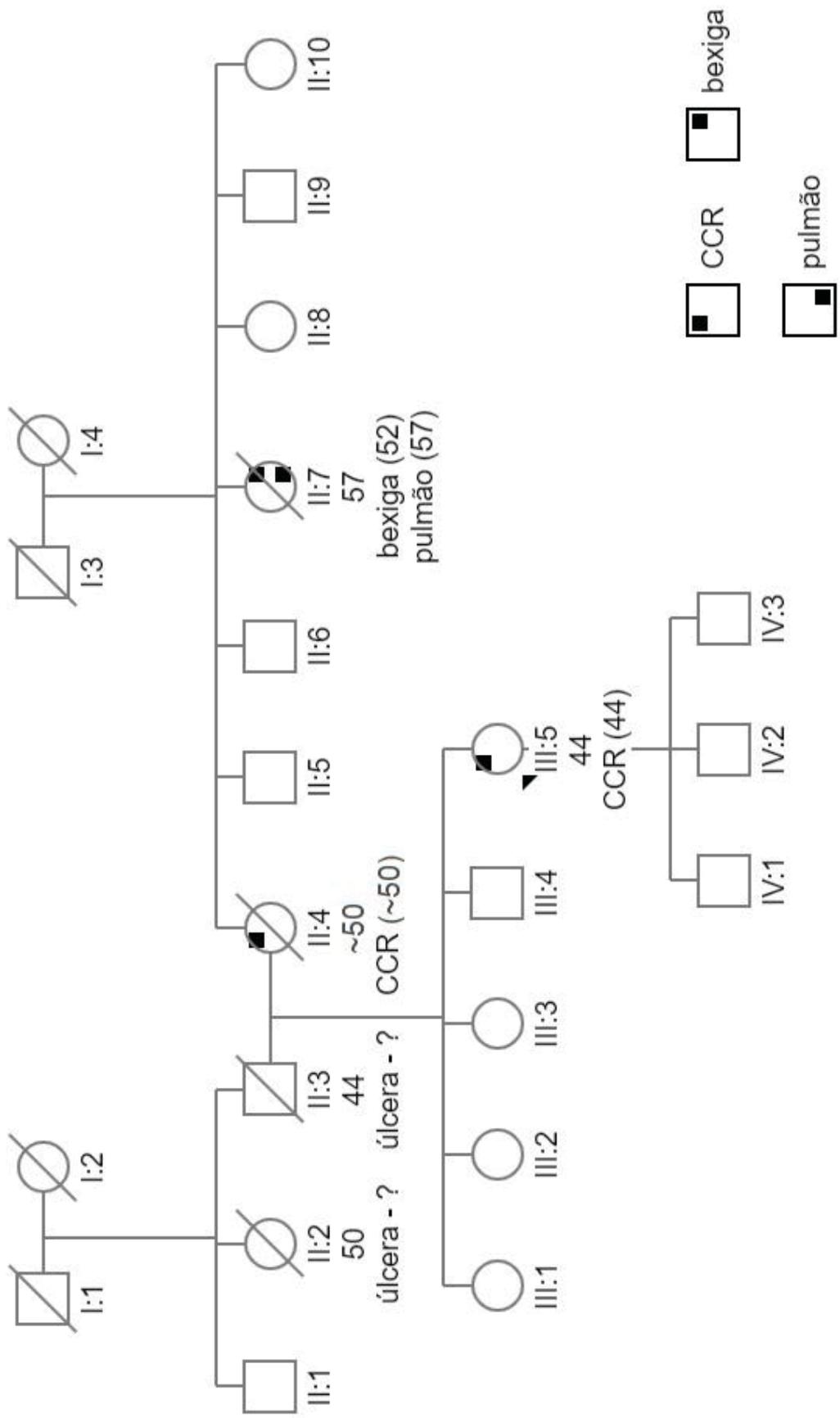
Probando P22
 IHQ (MSH2-/MSH6-)
 MSH2



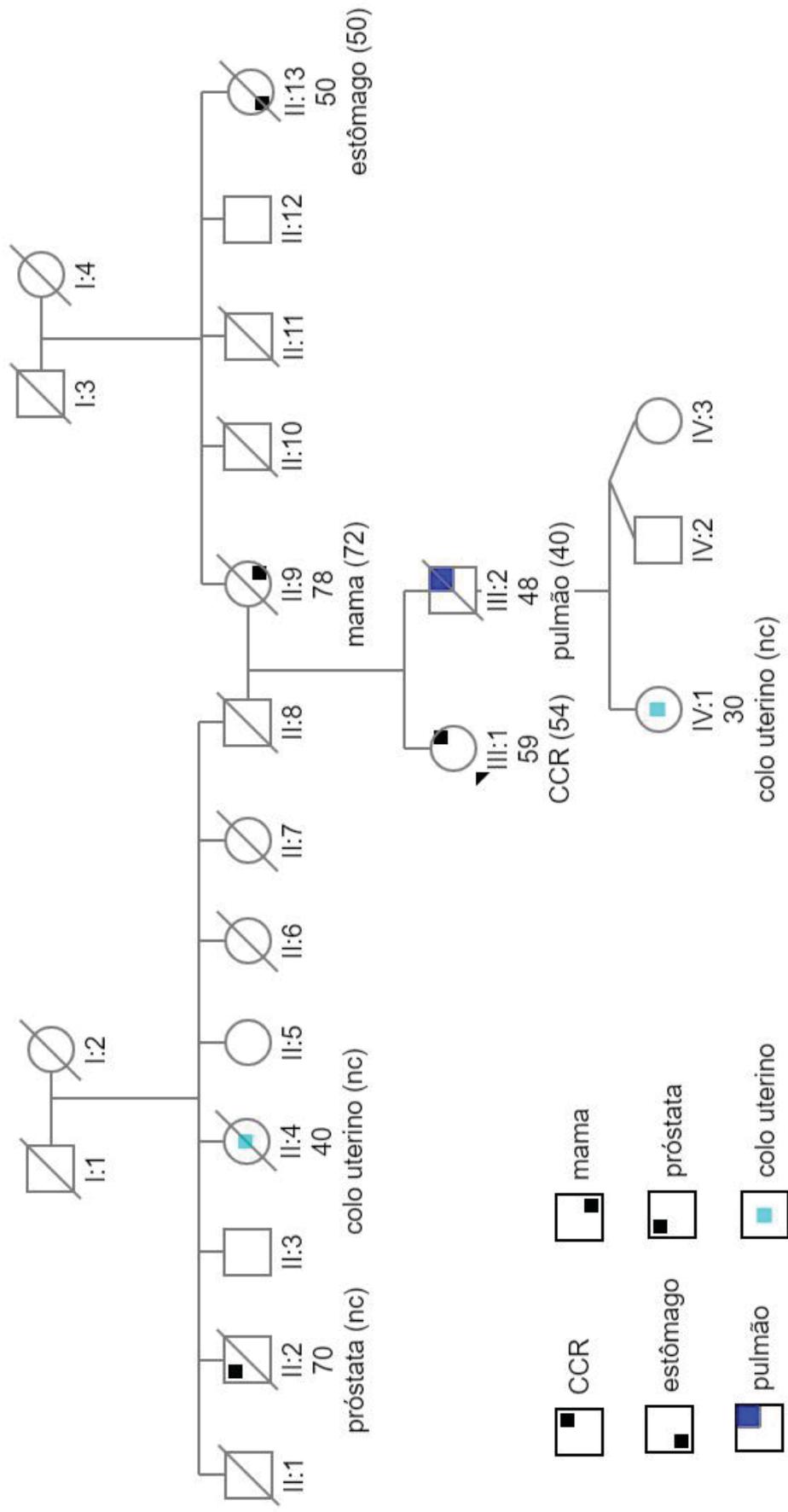
Probando P23
IHQ (PMS2-)
PMS2



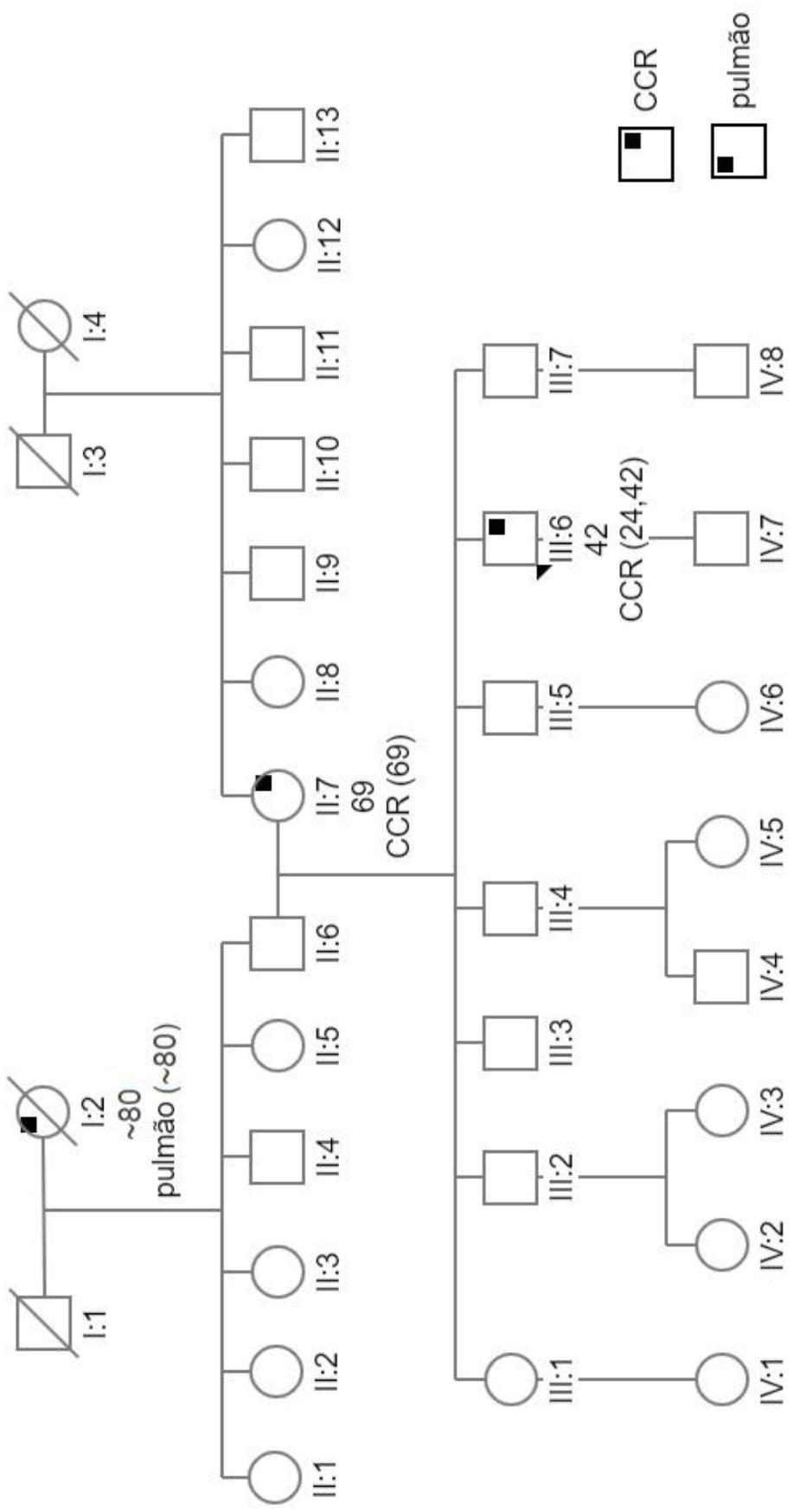
Probando P24
 IHQ (MSH2-)
 MSH2



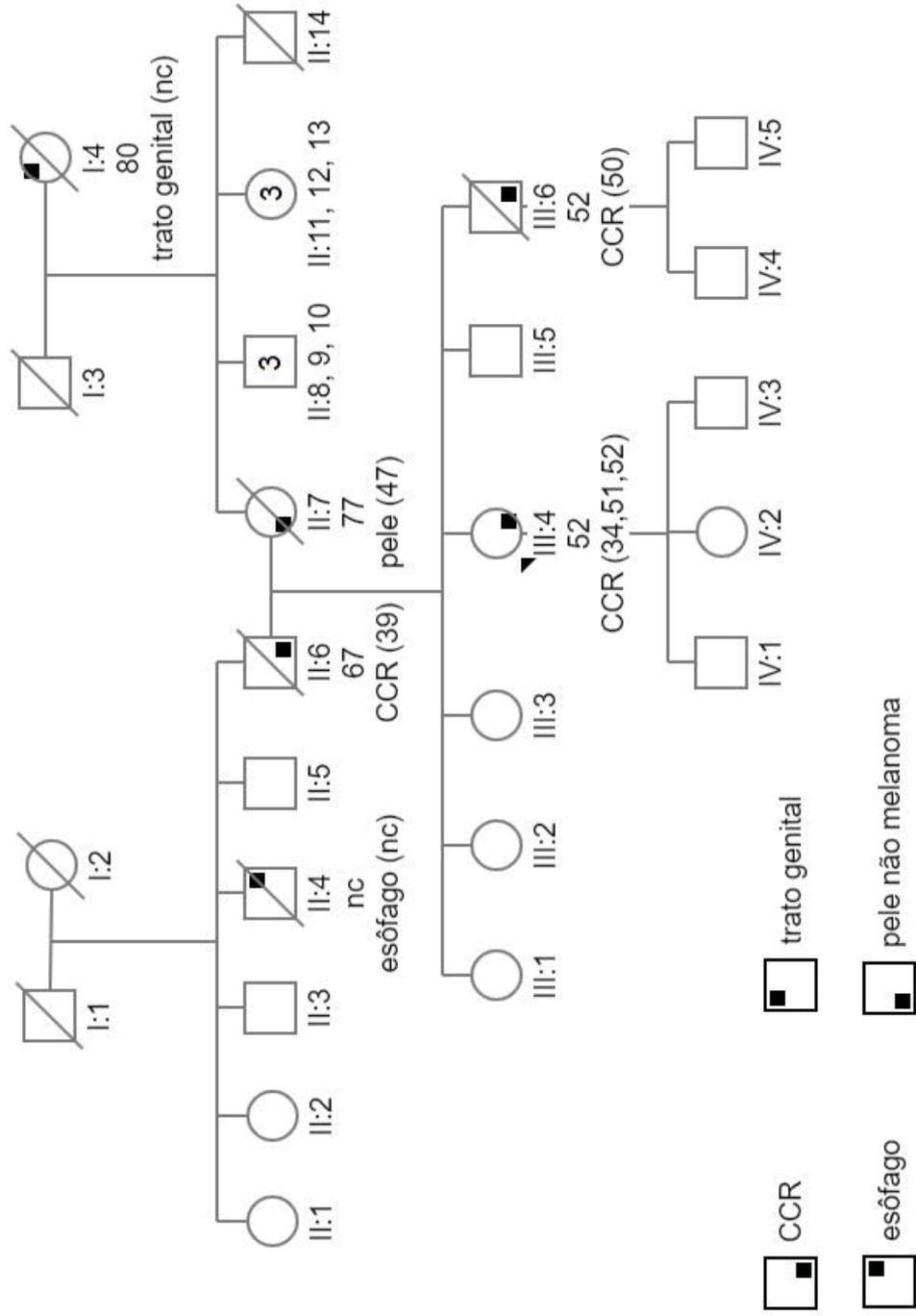
Probando P25
 Teste genético
 MLH1:c.676C>T



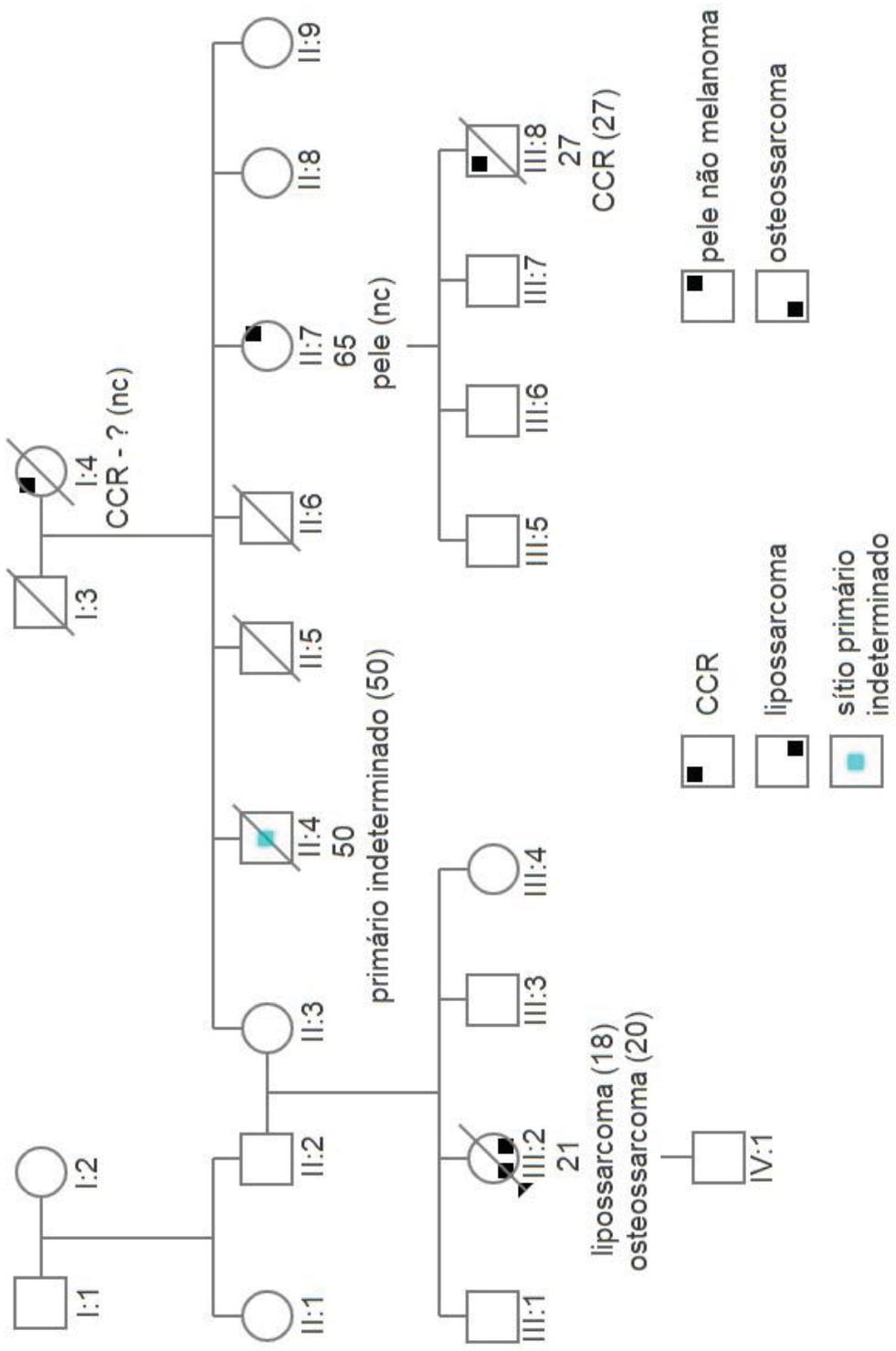
Probando P27
 IHQ (MSH2-)
 MSH2



Probando P28
 AC I + IHQ (MLH1-/PMS2-)
 MLH1



Probando P30
 Teste genético
 MSH2:c.2152C>T



Probando P31
 Teste genético
 MSH6:c.1723_1724insT

