Artigo Original / Original Article

DIAGNÓSTICO GENÉTICO NA SÍNDROMA DE LYNCH: IMPLICAÇÕES DA LOCALIZAÇÃO DE MUTAÇÕES GERMINAIS EM GENES DE REPARAÇÃO DO ADN

S. FERREIRA[1], I. CLARO[1], I. FRANCISCO[2], R. SOUSA[1], P. LAGE[1], C. ALBUQUERQUE[2], B. FILIPE[2], A. SUSPIRO[1], P. RODRIGUES[1], M. CRAVO[1,2], P. FIDALGO[1], C. NOBRE LEITÃO[1,2]

Resumo

Introdução: **O diagnóstico clínico da Síndroma de Lynch (SL) baseia-se nos critérios de Amesterdão (CA); adicionalmente, algumas famílias são identificadas com base nos critérios de Bethesda (CB). A SL resulta de mutações germinais em genes de reparação do ADN, sobretudo no *MLH1* e *MSH2*, mas também no *MSH6*, *PMS1* e *PMS2*. Não foram ainda identificadas localizações preferenciais das mutações nestes genes que permitam orientar o diagnóstico genético.**
Objectivos: **Em doentes de famílias com SL com mutações identificadas nos genes *MLH1*, *MSH2* ou *MSH6*, correlacionar as características clínicas com a localização das mutações.**
Doentes e Métodos: **Incluíram-se 58 doentes (21 H/37 M) pertencentes a 33 famílias com CA e 7 famílias com CB, todos com mutação germinal identificada num dos genes de reparação do ADN. Registou-se o tipo de tumor desenvolvido, a idade de diagnóstico e as características patológicas dos carcinomas do cólon e recto (CCR). A análise mutacional nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* foi efectuada por DGGE, seguida de sequenciação directa a partir do produto de PCR. Nas famílias cujo diagnóstico genético foi inconclusivo por DGGE, procedeu-se a MLPA para identificação de grandes delecções.**
Resultados: **Desenvolveram CCR 48/58 (83%) doentes, com uma média de idades de 45 anos (25-74). Os restantes 10 doentes apresentaram outros tumores do espectro da SL (6 endométrio, 2 ovário, 1 urotélio e 1 estômago). Foram identificadas 22 famílias com mutações no gene *MLH1*, 17 no gene *MSH2* e uma no gene *MSH6*. A maioria (76%) das mutações patogénicas no gene *MLH1* encontrava-se entre os exões 10 e 19, sendo neste grupo a média de idades de desenvolvimento do CCR mais tardia, 49,8 *versus* 32,5 anos (p=0,01) e mais frequente a presença de tumores extra-cólicos. No gene *MSH2*, 71% das mutações patogénicas encontravam-se entre os exões 1 e 8, tendo também estas predominado em famílias com tumores extra-cólicos.**
Conclusões: **Os resultados observados sugerem que, de acordo com as características das famílias, se deva iniciar o diagnóstico genético pelos exões mais frequentemente mutados em cada gene.**

Summary

Background: **HNPCC diagnosis is based on the Amsterdam criteria (AC), although some families are also identified using the Bethesda guidelines (BG). HNPCC is associated with germline mutations in the DNA mismatch repair genes, particularly *MLH1* and *MSH2*, but also *MSH6*, *PMS1* and *PMS2*. At present, no "hot-spots" have been identified that could direct genetic diagnosis.**
Aims: **In patients belonging to HNPCC families with identified mutations in *MLH1*, *MSH2* or *MSH6* genes, to correlate tumor characteristics with the location of the mutation.**
Patients and Methods: **We studied 58 patients (21M/37F) belonging to 33 families with AC and 7 families with BG, all with an identified germline mutation. Age of diagnosis and pathological characteristics of the colorectal cancer (CRC) were recorded, as well as the presence of HNPCC extracolonic cancers. Mutational analysis in *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes was performed by DGGE and direct sequencing. In families with no identified point mutations, we also performed MLPA for detection of large deletions.**
Results: **A total of 48/58 (83%) of the patients had CRC, with a mean age at diagnosis of 45 years (25-74). The remaining 10 patients had an HNPCC-associated cancer other than CRC (6 endometrial, 2 ovarian, 1 urinary tract and 1 stomach). We identified 22 families with *MLH1* mutations, 17 with *MSH2* mutations and one with a *MSH6* mutation. Most (76%) of the pathogenic mutations in *MLH1* gene were located between exons 10 and 19. In this location mean age of CRC diagnosis was higher, 49.8 *versus* 32.5 years (p=0.01) and more associated HNPCC extracolonic tumors were found. In *MSH2*, 71% of the mutations were located between exons 1 and 8 and, in this group, more extra-colonic tumors belonging to HNPCC spectrum were identified.**
Conclusions: **Our results suggest that based on family characteristics, genetic diagnosis should be started by the more frequently mutated exons in each gene.**

GE - J Port Gastrenterol 2006, 13: 82-88

(1) Serviço de Gastrenterologia.
(2) Centro de Investigação de Patobiologia Molecular.
Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil, Centro de Lisboa, Portugal.

Recebido para publicação: 12/10/2005
Aceite para publicação: 08/02/2006

INTRODUÇÃO

A Síndroma de Lynch (SL) ou carcinoma do cólon e recto hereditário não associado a polipose é uma doença hereditária com transmissão autossómica dominante, que resulta da presença de mutações germinais num de cinco genes de reparação do ADN: *MLH1, MSH2, MSH6, PMS1 e PMS2* (1). Esta entidade associa-se a um risco elevado de desenvolvimento de carcinoma do cólon e recto (CCR), que surge preferencialmente em idade jovem e em localização proximal. Em algumas famílias são também identificados outros tumores do espectro da SL, nomeadamente carcinomas do endométrio, estômago, pâncreas, vias biliares, urotélio, ovário e intestino delgado (2).

O diagnóstico clínico da SL baseia-se nos critérios de Amsterdão (CA), inicialmente publicados em 1991 (CA I) (3) - Quadro 1, e revistos em 1999, para incluírem tumores extra-cólicos do espectro (CA II) (4) - Quadro 2. Nestas famílias existe indicação para diagnóstico genético, com pesquisa de mutações germinais em genes de reparação do ADN. Cerca de 90% de todas as mutações identificadas envolvem os genes *MLH1* e *MSH2*, pelo que o diagnóstico genético é habitualmente iniciado através da sua análise (5).

Os CA apresentam limitações, tendo sido definidos em 1997 os Critérios de Bethesda (CB) (6,7) - Quadro 3, revistos num segundo *workshop* do *National Cancer Institute* em 2002 (8) - Quadro 4, e cujo objectivo principal consiste na identificação de novas famílias com SL que não preencham os critérios de Amsterdão. Os CB baseiam-se na pesquisa de instabilidade de microssatélites (IM), que no caso de ser de alto grau conduz a análise mutacional nos genes mais frequentemente envolvidos na SL.

Contudo, não se encontram descritas na literatura localizações preferenciais das mutações (habitualmente designadas por *hot-spots*) nos genes de reparação do ADN envolvidos na SL, que possibilitem orientar o diagnóstico genético, tornando-o mais célere e menos dispendioso.

O objectivo deste estudo foi procurar estabelecer uma correlação entre as características clínicas das famílias com mutação identificada em genes de reparação do ADN e a localização das mesmas, de forma a direccionar a sua pesquisa.

Quadro 1 - Critérios de Amsterdão I

1. Três ou mais familiares com CCR histologicamente confirmado, sendo um deles parente de 1º grau dos outros dois.
2. Pelo menos duas gerações sucessivas afectadas.
3. Pelo menos um dos CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos.
4. Exclusão de polipose adenomatosa familiar do cólon.

CCR = carcinoma do cólon e recto

Quadro 2 - Critérios de Amsterdão II

1. Três ou mais familiares com um tumor do espectro da SL histologicamente confirmado (CCR, endométrio, intestino delgado, ureter e pélvis renal), sendo um deles parente de 1º grau dos outros dois.
2. Pelo menos duas gerações sucessivas afectadas.
3. Pelo menos um dos tumores diagnosticado em idade inferior a 50 anos.
4. Exclusão de polipose adenomatosa familiar do cólon.

SL - Síndroma de Lynch; CCR - carcinoma do cólon e recto

DOENTES E MÉTODOS

Doentes

No presente estudo incluíram-se 58 doentes pertencentes a 40 famílias com SL, 21 do sexo masculino e 37 do sexo feminino, com mutação germinal identificada num dos genes de reparação do ADN: *MLH1, MSH2* ou *MSH6*. Destas famílias, 33 preenchiam os CA (24 famílias com CA II e 9 com CA I) e 7 os CB (6 apresentaram os critérios iniciais e revistos e uma preenchia apenas estes últimos).

Registaram-se o tipo de tumor desenvolvido, a idade de diagnóstico e as características patológicas dos CCR.

Análise Genética

A análise mutacional nos genes de reparação do ADN - *MLH1* (19 exões), *MSH2* (16 exões) e *MSH6* (10 exões), foi inicialmente realizada por *DGGE* (*Denaturating Gradient Gel Electrophoresis*).

Após obtenção de consentimento informado por parte dos doentes, foi efectuada colheita de sangue periférico e extraído ADN. Em seguida, cada um dos exões dos três genes foi analisado individualmente, utilizando-se os

Quadro 3 - Critérios de Bethesda

1. Indivíduos pertencentes a famílias que preenchem os critérios de Amsterdão.
2. Indivíduos com dois tumores do espectro da SL, incluindo CCR síncronos e metacrónicos ou tumores extra-cólicos associados*.
3. Indivíduos com CCR e um parente de 1º grau com CCR e/ou tumor extra-cólico associado à SL e/ou adenoma do cólon, um dos tumores diagnosticado antes dos 45 anos e o adenoma antes dos 40.
4. Indivíduos com CCR diagnosticado antes dos 45 anos.
5. Indivíduos com CCR do cólon direito, com padrão indiferenciado (sólido/cribriforme) na histologia, diagnosticado antes dos 45 anos.
6. Indivíduos com CCR com células em anel de sinete (>50%) diagnosticado antes dos 45 anos.
7. Adenomas do cólon diagnosticados antes dos 40 anos.

SL = Síndroma de Lynch; CCR = carcinoma do cólon e recto
*Carcinomas do endométrio, ovário, estômago, hepatobiliares, intestino delgado e carcinoma de células de transição da pélvis renal ou ureter

Quadro 4 - Critérios de Bethesda revistos.

1. Indivíduos com CCR diagnosticado em idade inferior a 50 anos.
2. Indivíduos com CCR síncronos ou metacrónicos, ou associação com outros tumores do espectro da SL*, independentemente da idade.
3. Indivíduos com CCR com características histológicas de instabilidade de alto grau (infiltrado linfocitário, reacção Crohn-like, tumores mucinosos ou com diferenciação em "anel de sinete" ou padrão de crescimento medular) diagnosticado em idade inferior a 60 anos.
4. Indivíduos com CCR e um ou mais parentes de 1º grau com um tumor do espectro da SL*, sendo um dos tumores diagnosticado em idade inferior a 50 anos.
5. Indivíduos com CCR e dois ou mais parentes de 1º ou 2º grau com tumores do espectro da SL*, independentemente da idade.

SL = Síndroma de Lynch; CCR = carcinoma do cólon e recto
*Tumores associados à SL incluem CCR, carcinomas do endométrio, estômago, ovário, pâncreas, ureter e pélvis renal, via biliar, cérebro (geralmente glioblastomas, como na Síndroma de Turcot), adenomas de glândulas sebáceas e queratoacantomas na Síndoma de Muir-Torre e carcinomas do intestino delgado.

primers descritos por Nystrom-Lathi e col. (9) e Wu e col. (10,11). Para aumentar a eficiência do método, os primers contêm numa extremidade uma região rica em guaninas e citosinas (*CG-clamp*), a qual tem uma temperatura de desnaturação muito elevada. De forma a promover a formação de heteroduplexes, após amplificação por PCR, cada exão foi submetido a desnaturação e incubação à temperatura de *annealing* dos *primers* respectivos. Em seguida, 10 µl do produto amplificado foram aplicados num gel de poliacrilamida a 6%, contendo um gradiente desnaturante específico para cada exão. A electroforese decorreu a uma voltagem de 160V em tampão TAE durante 4 horas, a uma temperatura de 60ºC. O gel foi corado com brometo de etídio, tendo as amostras sido visualizadas sob luz ultra-violeta. Para as amostras que apresentaram, em DGGE, um padrão diferente do controlo normal, isto é, um padrão correspondente à presença de uma alteração no ADN (Figura 1), procedeu-se a sequenciação directa a partir do produto de PCR.

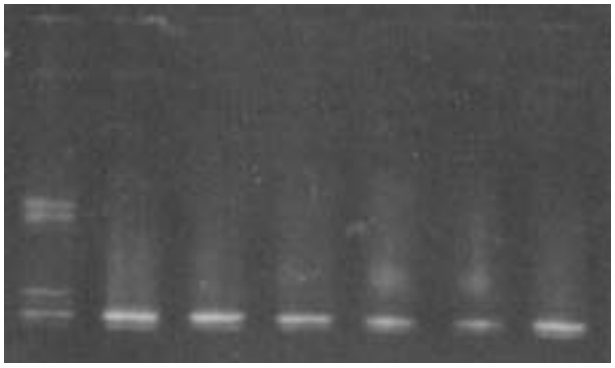

Figura 1 - Análise mutacional do exão 13 do gene *MSH2* por DGGE. Na linha 1 observa-se uma amostra com um padrão de 4 bandas correspondentes aos homoduplexes e heteroduplexes, indicativo da presença de uma alteração no ADN.

Cada exão foi amplificado por PCR, purificado e sequenciado recorrendo aos *kits Q/Aquick PCR purification (Quiagen)* e *kit fmol (Promega)*, respectivamente. Mais recentemente foi utilizado o *kit de sequenciação Big Dye terminator cycle sequencing (Applied Biosystems)*. Os produtos da reacção de sequenciação foram analisados num gel de poliacrilamida desnaturante e os resultados visualizados por auto-radiografia no primeiro caso, tendo sido analisados no sequenciador *ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)*, no último.
Nas famílias com diagnóstico genético inconclusivo para os genes *MLH1* e *MSH2*, após despiste de mutações pontuais pelo método acima referido, foi efectuada a pesquisa de grandes delecções por MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*). Esta é uma técnica quantitativa, que detecta alterações no número de cópias das sequências genómicas (número de exões), podendo envolver apenas um exão ou atingir a totalidade do gene (12-14). Na MLPA, após desnaturação das cadeias de ADN extraído do sangue periférico, procede-se à hibridação com sondas complementares às sequências genómicas, que as flanqueiam. Seguidamente, e caso tenha de facto ocorrido hibridação, tem lugar a ligação das sondas, por intermédio de uma enzima (ligase). As sondas ligadas são depois amplificadas, por PCR, e separadas por electroforese capilar. A quantidade relativa dos produtos de amplificação das sondas reflecte o número das sequências-alvo, ou seja, dos exões. A leitura é feita por *Genescan*, considerando-se que ocorreu uma grande delecção quando existe uma redução da área relativa do pico, correspondente a um determinado exão, na ordem dos 35 a 55% (Figura 2).
Nos casos em que a MLPA identificou delecções envolvendo apenas um exão, a sua presença foi sempre confirmada através de sequenciação da região flanqueadora do exão, para certificação de que não existia nenhuma variante na zona de ligação da sonda que pudesse indicar um falso positivo.

Análise Estatística

Na análise estatística utilizou-se o teste t de Student para comparação de variáveis contínuas e o teste do χ^2 para comparação de proporções (STATA 8.0).

RESULTADOS

Verificou-se que 48/58 (83%) dos doentes desenvolveram CCR, com uma média de idades de 45 anos (25-74). A maioria (67%) dos carcinomas localizou-se no cólon direito, tendo 14% ocorrido no cólon esquerdo e 19% no recto. Os restantes 10/58 doentes desenvolveram tumo-

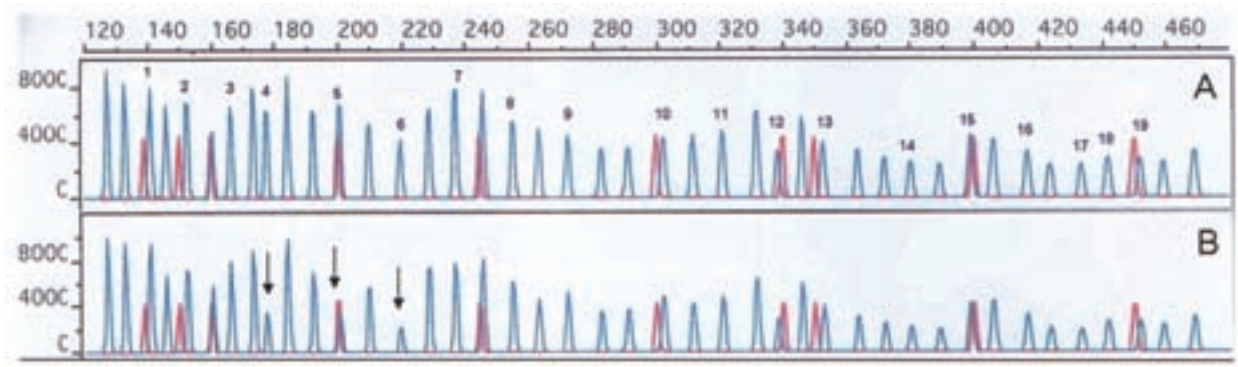

Figura 2 - Electroforetogramas obtidos por GeneScan, representativos de um controlo normal (A) e uma amostra com delecção dos exões 4 a 6 do gene MLH1 (B, setas) por MLPA. Os picos a azul correspondem a diferentes sondas, estando as do MLH1 numeradas de acordo com cada exão. Os picos a vermelho correspondem ao marcador de peso molecular interno.

res do espectro da SL, designadamente 6 carcinomas do endométrio, 2 carcinomas do ovário, 1 carcinoma do urotélio e 1 carcinoma gástrico.

Foram identificadas 22 famílias com mutação no gene *MLH1*, 17 no gene *MSH2* e uma no gene *MSH6*. Das 40 famílias incluídas, 36 apresentaram mutações pontuais e 4 grandes delecções, 3 localizadas no gene *MSH2* e 1 no gene *MLH1*. Relativamente ao tipo de mutação e considerando o gene *MLH1*, foram encontradas 10 mutações *nonsense*, 5 *frameshift*, 5 *missense*,1 *splicing* e 1 grande delecção. No gene *MSH2* foram identificadas 6 mutações *nonsense*, 3 *frameshift*, 5 *splicing* e 3 grandes delecções.

A caracterização das mutações em cada um dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* e do fenótipo correspondente aos elementos afectados encontram-se descritos no Quadro 5.

Na análise dos dados excluíram-se as famílias com mutações *missense*, já que estas são de patogenicidade incerta. Realizaram-se duas análises, a global incluindo 35 famílias com mutações patogénicas e outra excluindo as 4 com grandes delecções (31 famílias). Os resultados obtidos apresentaram significado estatístico idêntico. Discriminamos em seguida os resultados da análise global.

A maioria das mutações patogénicas no gene *MLH1*, correspondendo a 13/17 (76%) mutações, encontrou-se acima do exão 9 (exões 10 a 19). O exão 16 foi o mais frequentemente envolvido (5 famílias), correspondendo à identificação de 4 mutações diferentes. Neste grupo de doentes, a média de idades do diagnóstico de CCR foi significativamente superior quando comparada com o grupo de doentes com mutação identificada entre os exões 1 e 9 - 49,8 *versus* 32,5 anos (p=0,01).

Adicionalmente, a análise das famílias revelou que 8/10 (80%) das que preenchiam os CA II se encontravam associadas a mutações acima do exão 9, contrariamente a apenas 2/10 (20%) que apresentaram mutações localizadas entre os exões 1 a 9.

No gene *MSH2*, verificou-se que 71% (12/17) das mutações patogénicas se localizaram até ao exão 8 (exões 1 a 8). Ao analisar as famílias, registámos que 82% (9/11) das que preenchiam CA II apresentaram mutações até ao exão 8 e apenas 18% (2/11) a jusante deste exão.

Relativamente ao gene *MSH6*, apenas identificámos uma mutação, pelo que não foi possível estabelecer correlações.

DISCUSSÃO

A SL é uma doença hereditária que se associa a mutações germinais em genes de reparação do ADN, encontrando-se a maioria localizada nos genes *MLH1* e *MSH2* (5). O indivíduo portador de uma mutação patogénica apresenta um risco muito elevado de desenvolvimento de CCR ao longo da vida (cerca de 80%), mas também de outros tumores, extra-cólicos (2).

Os CA I foram inicialmente elaborados com o objectivo de permitir uma uniformização na identificação destas famílias. Consistem em critérios clínicos que se baseiam na história familiar de CCR e apresentam limitações (3). Nesse sentido, foram posteriormente revistos para contemplarem alguns dos tumores extra-cólicos associados ao espectro da SL, surgindo os CA II (4). As famílias que os preencham têm indicação para diagnóstico genético nos genes de reparação do ADN mais frequentemente responsáveis por esta entidade. A identificação de uma mutação patogénica num desses genes constitui o exame mais fidedigno para o diagnóstico da SL. Contudo, existem famílias com SL que não preenchem os CA. As razões para este acontecimento são diversas, nomeadamente a pequena dimensão da família e o desconhecimento do elemento que fornece a história (*proband*) relativamente a dados dos familiares que desenvolveram cancro. Os CB seleccionam casos adicionais a serem

Quadro 5 - Descrição das mutações em cada um dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* e do fenótipo correspondente, relativamente ao número de famílias envolvidas e elementos afectados e ao número, tipo de tumores e idade de diagnóstico dos carcinomas do cólon e recto

Descrição da mutação	Famílias (número)	Doentes (número)	Número e tipo de tumor	Idade de diagnóstico CCR
		MLH1		
C→T codão 26 **exão 1**	2	2	2 CCR	33; 32
C→T codão 66* **exão 2**	1	2	2 CCR	32;53
C→T codão 226 **exão 8**	1	1	CCR	36
G→A codão 213* **exão 8**	1	1	CCR	34
Del G codão 354 **exão 12**	1	3	2 Endométrio; 1 CCR	25
C→T codão 487 **exão 13**	2	4	Endométrio; Ovário; 2 CCR	51;69
Del GG codão 540 **exão 14**	3	3	3 CCR	66; 47; 46
T→A codão 607* **exão 16**	1	1	CCR	36
AA→CG codão 618* **exão 16**	2	2	2 CCR	70; 35
G→A codão 631 **exão 16**	1	1	CCR	58
G→T codão 632 **exão 16**	1	1	CCR	49
G→T codão 659 **exão 17**	1	2	2 CCR	35;38
T→A codão 721 **exão 19**	2	5	5 CCR	43; 46; 57; 71; 74
Del G codão 754 **exão 19**	2	2	2 CCR	37; 48
Del **exões 4-6**	1	1	CCR	34
		MSH2		
C→T codão 183 **exão 3**	1	3	Estômago; ovário; CCR	67
Ins CT no codão 257 **exão 4**	2	3	Endométrio; 2 CCR	38;63
A→T local *splicing* **exão 5**	4	6	Endométrio; 5 CCR	27; 47; 41; 57; 26
C→T codão 288 **exão 5**	1	1	CCR	37
A→C local *splicing* **exão 8**	1	3	Endométrio; 2 CCR	40;30
C→T codão 518 **exão 10**	1	3	3 CCR	43;55;51
G→T codão 561 **exão 11**	1	1	CCR	51
C→T codão 718 **exão 13**	2	2	2 CCR	56;30
Ins TT no codão 787 **exão 14**	1	1	Urotélio	Não aplicável
Del **exões 2-10**	1	1	CCR	41
Del **exão 2**	1	1	CCR	30
Del **exão 5**	1	1	CCR	53
		MSH6		
Del C codão 1086 **exão 5**	1	1	CCR	39

CCR = carcinoma do cólon e recto; Del = delecção; Ins = inserção; C - Citosina; G = Guanina; A = Adenina; T= Timina; * = mutação *missense*.

submetidos a diagnóstico genético com o objectivo de identificar novas famílias com SL (6-8). Baseiam-se na pesquisa de instabilidade de microssatélites (IM) no CCR, considerada um marcador intermediário. A IM resulta da inactivação dos genes de reparação do ADN, que condiciona o aparecimento de erros em sequências repetitivas de nucleótidos dispersas pelo genoma. A presença de IM de alto grau, ou seja, positividade em pelo menos 40% dos marcadores testados (marcadores de Bethesda - BAT-25, BAT-26, D5S346, D2S123 e D17S250) (6), constitui indicação para diagnóstico genético. Com efeito, sabe-se que a maioria dos CCR associados à SL apresentam IM de alto grau, o que sucede apenas num subgrupo de CCR esporádicos (15,16).

A identificação de uma mutação germinal patogénica num dos genes de reparação do ADN de um elemento afectado pertencente a uma família com SL permite a pesquisa da mesma nos elementos em risco, evitando assim a vigilância preconizada ou afirmando a sua necessidade, caso o diagnóstico genético seja negativo ou positivo, respectivamente. O diagnóstico genético é, no entanto, um procedimento com metodologia complexa e morosa, sobretudo porque não se reconhecem localizações preferenciais das mutações responsáveis pela SL. A imunohistoquímica pode orientar parcialmente o diagnóstico genético, ao avaliar a expressão das proteínas dos genes de reparação do ADN no tecido tumoral. Se uma das proteínas se encontrar ausente, a análise mutacional deve iniciar-se por esse gene (17,18), mas esta técnica muitas vezes não se encontra disponível.

O objectivo do presente trabalho foi tentar identificar, para os genes de reparação do ADN mais frequentemente mutados na SL, localizações preferenciais das mutações, de acordo com as características das famílias. Detectou-se um maior número de mutações no gene *MLH1* (55%) relativamente ao *MSH2* (42,5%), o que está de acordo com os resultados obtidos pela maioria dos grupos (19,20).

Relativamente ao gene *MSH6*, identificámos apenas uma família com mutação (2,5%), percentagem esta inferior à descrita na literatura, segundo a qual este gene é responsável por 5 a 10% das mutações identificadas (21). No entanto, é necessário referir que o nosso estudo só incluiu famílias com CA ou, na sua ausência, com CB e IM de alto grau. É reconhecido que a penetrância de uma mutação patogénica no gene *MSH6* é significativamente menor, traduzindo-se, nomeadamente, por uma menor incidência de CCR (22). Por essa razão, muitas vezes as famílias não cumprem os critérios de Amesterdão. Por outro lado, os tumores apresentam menos frequentemente IM de alto grau (22,23). Estes dois factores associados podem explicar a baixa taxa de detecção de mutações neste gene, no nosso estudo.

Relativamente à localização das mutações em cada gene, verificámos que no gene *MLH1* se registou um predomínio significativo de mutações patogénicas acima do exão 9 (76%), tendo esta diferença obtido significado estatístico. A identificação de 4 mutações diferentes no exão 16 vem sublinhar os dados publicados em alguns trabalhos, que apontam a região dos exões 15 e 16 como *clusters* mutacionais para este gene (24). A identificação de 5/22 (22,7%) mutações *missense* no *MLH1* está de acordo com os valores referidos na literatura (5) e, por poder dificultar a interpretação dos dados devido à patogenicidade incerta, excluímo-las da análise.

Verificou-se ainda que, no grupo de doentes com mutação identificada acima do exão 9, a média de idades de diagnóstico do CCR foi significativamente mais tardia, o que sugere que se inicie o diagnóstico genético pelos exões mais a jusante nas famílias com CCR em idades mais avançadas. Observámos também que as mutações na metade distal do gene *MLH1* surgiram preferencialmente em famílias com CA II, contrariamente às que ocorreram nos exões mais proximais. Este resultado favorece, assim, que o início do diagnóstico genético no gene *MLH1* se efectue pelos exões mais distais, não só em presença de CCR em idade mais tardia, mas também em presença de outros tumores do espectro da SL.

Nos doentes com diagnóstico genético positivo para o gene *MSH2* verificámos que as mutações patogénicas se localizaram predominantemente até ao exão 8 e que a maioria dos casos pertenciam a famílias com CA II. Este facto sugere que o início da pesquisa mutacional no gene *MSH2* se efectue pelos exões proximais, particularmente nas famílias com tumores extra-cólicos.

No presente estudo não foram detectadas mutações *missense* para o gene *MSH2*, contrariamente ao valor publicado na literatura, estimado em cerca de 16% (2).

Salientamos ainda que 4 mutações identificadas no presente trabalho correspondem a grandes delecções, traduzindo assim a perda de pelo menos um exão do gene mutado. A sua pesquisa, em famílias com diagnóstico genético inconclusivo por técnicas de detecção de mutações pontuais como a DGGE, tem-se revelado bastante promissora (12,14). No nosso estudo, a pesquisa de grandes delecções por MLPA aumentou a eficácia do diagnóstico genético, tendo identificado a causa molecular responsável pela SL numa percentagem significativa de famílias com diagnóstico inconclusivo seguidas na nossa Instituição (4/16 - 25%) (dados não publicados). Tal como noutros trabalhos (12), também neste foi detectado um maior número de grandes delecções no gene *MSH2* relativamente ao *MLH1*. Pela sua simplicidade, rapidez e eficácia, sugerimos a pesquisa de grandes delecções em famílias que preencham os cri-

térios de Amesterdão, sempre que não forem identificadas mutações pontuais nos genes *MLH1* e *MSH2*, pelas técnicas convencionais de análise mutacional.
Muito embora não estejam ainda identificadas localizações preferenciais das mutações para os genes de reparação do ADN responsáveis pela SL que permitam direccionar o diagnóstico genético, o presente trabalho sugere que, de acordo com as características das famílias, se deva iniciar a análise mutacional pelos exões mais frequentemente mutados em cada gene.

Correspondência:

Sara Ferreira
Instituto Português de Oncologia de Francisco Gentil - Centro de Lisboa
Rua Professor Lima Basto
1099-023 Lisboa
Fax: 217 229 855
e-mail: saragferreira@netcabo.pt

BIBLIOGRAFIA

1. Papadopoulos N, Lindblom A. Molecular basis of HNPCC: mutations of MMR genes. Hum Mutat 1997; 10: 89-99.
2. Watson P, Lynch HT. Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. Cancer 1993; 71: 677-85.
3. Vasen HF, Mecklin JP, Khan PM, Lynch HT. The International Collaborative Group on Herediatry Non-Polyposis Colorectal Cancer (ICG-HNPCC). Dis Colon Rectum 1991; 34: 424-5.
4. Vasen HF, Watson P, Mecklin JP, Lynch HT. New clinical criteria for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC, Lynch syndrome) proposed by the International Collaborative group on HNPCC. Gastroenterology 1999; 116: 1453-6.
5. Lynch HT, de la Chapelle A. Hereditary colorectal cancer. N Engl J Med 2003; 348: 919-32.
6. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, et al. A National Cancer Institute Workshop on Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer Syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. J Natl Cancer Inst 1997; 89: 1758-62.
7. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, 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 Res 1998; 58: 5248-57.
8. Umar A, Boland R, Terdiman J, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and microsatellite instability. J Nat Cancer Inst 2004; 96: 261-68.
9. Nystrom-Lahti M, Wu Y, Moisio AL, Hofsta RM, Osinga J, Mecklin JP, et al. DNA mismatch repair gene mutations in 55 kindreds with verified or putative hereditary non-polyposis colorectal cancer. Hum Mol Genet 1996; 5: 763-9.
10. Wu Y, Nystrom-Lahti M, Osinga J, Looman MW, Peltomaki P, Aaltonen LA, et al. MSH2 and MLH1 mutations in sporadic replication error-positive colorectal carcinoma as assessed by two-dimensional DNA electrophoresis. Genes Chromosomes Cancer 1997; 18: 269-78.
11. Wu Y, Berends M, Mensink R, Kempinga C, Sijmons R, Hofstra R, et al. Association of Hereditary Nonpolyposis Colorectal cancer-Related Tumors Displaying Low Microsatellite Instability with MSH6 Germline Mutations. Am J Hum Genet 1999; 65: 1291-98.
12. Bunyan D, Eccles D, Sillibourne J, Wilkins E, Simon Thomas N, Shea-Simonds J, et al. Dosage analysis of cancer predisposition genes by multiplex ligation-dependent probe amplification. Br J Cancer 2004; 91: 1155-59.
13. Gille J, Hogervorst F, Pals G, Wijnen J, van Schooten R, Dommering C, et al. Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. Br J Cancer 2002; 87: 892-97.
14. Wang Y, Friedl W, Lamberti C, Jungck M, Mathiak M, Pagenstecher C, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: frequent occurrence of large genomic deletions in MSH2 and MLH1 genes. Int J Cancer 2003; 103: 636-41.
15. Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal cancer carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. Am J Pathol 1994; 145: 148-156.
16. Lage P, Cravo M, Albuquerque C, Gomes T, Claro I, Chaves P, et al. Instabilidade de microssatélites em carcinomas do cólon e recto esporádicos: valor na detecção de novos casos de síndromes hereditários. GE-Jornal Português de Gastrenterologia 1998; 5:13-20.
17. Lindor NM, Burgart LJ, Leontovich O, Goldberg RM, Cunningham JM, Sargent DJ, et al. Immunohistochemistry versus microsatellite instability testing in phenotyping colorectal tumors. J Clin Oncol 2002; 20: 1043-48.
18. Chaves P, Cruz C, Lage P, Claro I, Cravo M, Nobre Leitão C, Soares J. Immunohistochemical detection of mismatch repair gene proteins as a useful tool for the identification of colorectal carcinoma with mutator phenotype. J Pathol 2000; 191: 355-60.
19. Peltomaki P, Gao X, Mecklin J-P. Genotype and phenotype in hereditary nonpolyposis colon cancer: a study of families with different vs. shared predisposing mutations. Familial Cancer 2001; 1: 9-15.
20. Scott R, McPhillips M, Meldrum C, Fitzgerald P, Adams K, Spigelman A, et al. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer in 95 families: differences and similarities between mutation-positive and mutation-negative kindreds. Am J Hum Genet 2001; 68: 118-127.
21. Peltomaki P, Vasen HF. Mutations predisposing to hereditary nonpolyposis colorectal cancer: database and results of a collaborative study: The International Collaborative Group on Hereditary Non Polyposis Colorectal Cancer. Gastroenterology 1997; 113: 1146-58.
22. Wagner A, Hendriks Y, Meijers-Heijboer E, Leeuw W, Morreau H, Hofstra R, et al. Atypical HNPCC owing to MSH6 germline mutations: analysis of a large Dutch pedigree. J Med Genet 2001; 38: 318-22.
23. Plaschke J, Engel C, Kruger S, Holinski-Feder E, Pagenstecher C, Mangold E, et al. Lower incidence of colorectal cancer and later age of disease onset in 27 families with pathogenic MSH6 germline mutations compared with families with MLH1 or MLH2 mutations: The German hereditary nonpolyposis colorectal cancer consortium. J Clin Oncol 2004; 22: 4486-94.
24. Wijnen J, Meera Khan P, Vasen H, Menko F, van der Klift H, van den Broek M, et al. Majority of hMLH1 mutations responsible for hereditary nonpolyposis colorectal cancer cluster at the exonic region 15-16. Am J Hum Genet 1996; 58: 300-7.