



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

PAULO MOZART DE BARROS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO DE
NOVA GERAÇÃO (NGS) E IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) NO DIAGNÓSTICO DE
SÍNDROME DE LYNCH EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE
AMSTERDAM II**

Recife/PE

2023

PAULO MOZART DE BARROS

**AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO DE
NOVA GERAÇÃO (NGS) E IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) NO DIAGNÓSTICO DE
SÍNDROME DE LYNCH EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE
AMSTERDAM II**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Cirurgia. Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Álvaro Antônio Bandeira Ferraz

Coorientador: Prof. Dr. Vandrê Cabral Gomes Carneiro

Recife/PE

2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Barros, Paulo Mozart de.

Avaliação comparativa entre método de sequenciamento de nova geração (NGS) e imunohistoquímica (IHQ) no diagnóstico de síndrome de Lynch em pacientes com critérios clínicos de Amsterdam II / Paulo Mozart de Barros. - Recife, 2023.

51 f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, Pós-Graduação em Cirurgia, 2023.

Orientação: Álvaro Antônio Bandeira Ferraz.

Coorientação: Vandrê Cabral Gomes Carneiro.

Inclui referências, apêndice e anexo.

1. Síndrome de Lynch; 2. Imunohistoquímica; 3. NGS; 4. Câncer colorretal hereditário. I. Ferraz, Álvaro Antônio Bandeira. II. Carneiro, Vandrê Cabral Gomes. III. Título.

UFPE-Biblioteca Central

PAULO MOZART DE BARROS

“AVALIAÇÃO COMPARATIVA ENTRE MÉTODO DE SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (NGS) E IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ) NO DIAGNÓSTICO DE SÍNDROME DE LYNCH EM PACIENTES COM CRITÉRIOS CLÍNICOS DE AMSTERDAM II”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação Em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Médicas, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Cirurgia. Área de concentração: Cirurgia Clínica Experimental.

Aprovada em: 31/07/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. ÁLVARO ANTÔNIO BANDEIRA FERRAZ (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. PAULO ROBERTO CAVALCANTI CARVALHO
(Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. EUCLIDES DIAS MARTINS FILHO (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, José Paulo e Cícera, que sempre me guiaram na busca pelo conhecimento e pelo exemplo de força, caráter, honestidade e amor.

Ao meu irmão, por todo apoio.

À Juscielle, por todo amor e companheirismo.

A todos os meus familiares e amigos, por cada palavra de esperança e conforto.

À minha primeira orientadora, Dra Isabella Monlleó, por me mostrar o caminho e satisfação na pesquisa em genética.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Álvaro Ferraz, pela oportunidade de crescimento e aprendizado acadêmico, além de ser um grande exemplo profissional.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Vandrê Carneiro, pela receptividade, dedicação e grande ajuda na concretização desta jornada.

Aos Profs. participantes da banca de qualificação: Dr. Euclides Martins e Dr. Paulo Roberto Carvalho pela leitura cuidadosa e pelas importantes e enriquecedoras sugestões.

Ao Hospital Israelita Albert Einstein / PROADI-SUS pelo apoio na realização desta pesquisa.

À Deus, por me guiar até aqui.

*"É necessário olhar para a frente da colheita,
não importa o quão distante isso seja, quando
uma fruta for colhida, algo bom acontece."*

Charles Darwin.

RESUMO

Introdução: O câncer colorretal (CCR) é o terceiro câncer mais incidente no mundo e o segundo de maior mortalidade no planeta. A predisposição hereditária ao CCR mais comum é a síndrome de Lynch (SL), caracterizada por mutações germinativas em um dos genes de reparo de DNA (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ou no gene EPCAM). Os protocolos atuais sugerem, para o diagnóstico precoce, a triagem através de critérios clínicos seguido de imunohistoquímica (IHQ) antes do sequenciamento genético. Todavia, a realização do sequenciamento de nova geração (NGS) permite a diminuição na jornada diagnóstica da Síndrome de Lynch.

Objetivo: Avaliar a correlação da IHQ e sequenciamento NGS para diagnóstico de SL entre os pacientes que preenchem critérios clínicos de Amsterdam II.

Materiais e métodos: estudo observacional composto por 20 pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos no momento do diagnóstico de câncer colorretal e que preenchem o critério clínico de Amsterdam modificado, cadastrados no “Projeto Genomas Raros”, avaliados através de IHQ da peça tumoral e NGS de amostra de sangue periférico. **Resultados:** A idade média no momento do diagnóstico do CCR foi de 46 anos, sendo mais frequente na população feminina (65%). Em relação a IHQ, foram observados 10 pacientes (50%) com ausência de expressão da proteína MMR. O NGS obteve 8 (40%) resultados positivos para Síndrome de Lynch, sendo 4 com variante patogênica em MLH1 e em quatro, em MSH2. Houve correlação entre IHQ e NGS em 14 casos, sendo em 6 (30%) uma confirmação diagnóstica da IHQ pelo NGS e em 8 casos (40%), verificou-se uma exclusão diagnóstica de SL pela IHQ e NGS. Em dois casos, ocorreu a confirmação de variante patogênica em MLH1 pelo NGS, nos quais foram observadas as mesmas grandes deleções, contrariando a IHQ com presença da expressão das proteínas MMR. **Conclusão:** A correlação entre os dois métodos diagnósticos utilizados (IHQ e NGS) pode ser estabelecida de forma moderada, indicada pelo coeficiente Kappa de 0,510, a partir da triagem por critérios clínicos de Amsterdam II.

Palavras-chave: Neoplasias Colorretais. Síndrome de Lynch. Instabilidade de microsatélites. Sequenciamento Completo do Genoma. Imuno-Histoquímica.

ABSTRACT

Comparative evaluation between Next Generation Sequencing (NGS) and Immunohistochemistry (IHC) in the diagnosis of Lynch Syndrome in patients with clinical criteria of Amsterdam II

Introduction: Colorectal cancer is the third most incident cancer in the world and the second with the highest mortality. One of its hereditary forms is Lynch syndrome, characterized by mutations in one of the DNA repair genes (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 or EPCAM). Current protocols suggest, for early diagnosis, screening through clinical criteria followed by immunohistochemistry (IHC) before genetic sequencing. However, performing next-generation sequencing (NGS) allows for a reduction in the Lynch Syndrome diagnostic journey. **Objective:** Assess the correlation of IHC and NGS sequencing for the diagnosis of LS among patients who fulfill the Amsterdam II clinical criteria. **Materials and methods:** observational study composed of 20 patients, both genders, aged between 18 and 70 years at the time of colorectal cancer diagnosis, fulfilling Amsterdam II clinical criteria, registered in “Projeto Genomas Raros”, evaluated through IHC of the malignant tumor and blood sample NGS. **Results:** The mean age at diagnosis of colorectal cancer was 46 years, being more frequent in the female population (65%). Regarding the IHC, 10 patients (50%) were observed with deficient MMR. The NGS obtained 8 (40%) positive results for Lynch Syndrome, 4 with a pathogenic variant in MLH1 and in four, in MSH2. There was a correlation between IHC and NGS in 14 cases, in 6 (30%) a diagnostic confirmation of IHC by the NGS and in 8 cases (40%), there was a diagnostic exclusion of LS by the IHC and NGS. In two cases, there was confirmation of a pathogenic variant in MLH1 by NGS, in which the same large deletions were observed, contradicting IHC with proficient MMR. **Conclusion:** The correlation between the two diagnostic methods used (IHC and NGS) can be moderately established, indicated by the Kappa coefficient of 0.510, from the screening by clinical criteria of Amsterdam II.

Keywords: Colorectal Neoplasms. Lynch Syndrome. Microsatellite Instability. Complete Genome Sequencing. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma	13
Figura 2 –	Instabilidade de microssatélites causada por funcionamento inadequado das proteínas MMR.	15
Figura 3 –	Atuação dos dímeros de proteínas MMR no reparo do DNA	17
Figura 4 –	Investigação positiva através da IHQ em MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2	19
Figura 5 –	Algoritmo para diagnóstico molecular de Síndrome de Lynch	22
Figura 6 –	Idade (em anos) ao diagnóstico do câncer colorretal	29
Gráfico 1 –	Avaliação da IHQ do tecido tumoral	30
Quadro 1 –	Interpretação dos valores de Kappa	28
Quadro 2 –	Relação entre IHQ e resultado do sequenciamento genético (NGS)	33
Figura 7 -	Relação entre resultado IHQ e gene MMR com variante patogênica para Síndrome de Lynch	35

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Distribuição da frequência conforme gênero.	29
Tabela 2 –	Distribuição da IHQ conforme frequência	30
Tabela 3 –	Distribuição do sequenciamento genético (NGS) conforme frequência.	31
Tabela 4 –	Correlação entre imunohistoquímica (IHQ) e sequenciamento genético (NGS)	31
Tabela 5 –	Correlação entre as proteínas MMR na imunohistoquímica (IHQ) e genes MMR pelo sequenciamento genético (NGS)	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCR	Câncer colorretal
CIMP	Fenótipo metilador de ilhas CpG
CIN	Instabilidade cromossômica
IHQ	Imunohistoquímica
MLH1	proteína mutL homolog 1
MMR	Genes reparadores de emparelhamento
MSH2	proteína mutS homolog 2
MSH6	proteína mutS homolog 6
MSI	Instabilidade de microssatélites
NGS	Sequenciamento de Nova Geração
PAF	Polipose Adenomatosa Familiar
PMS2	proteína postmeiotic segregation increased 2
SL	Síndrome de Lynch
VUS	Variante de Significado Incerto

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	23
3	MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1	Tipo e local de estudo	24
3.2	Critérios de inclusão	24
3.3	Critérios de exclusão	24
3.4	Procedimentos éticos	24
3.5	Procedimentos técnicos	25
3.6	Amostra	26
3.7	Testes estatísticos	27
4	RESULTADOS	29
5	DISCUSSÃO	34
6	CONCLUSÃO	39
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	40
	APÊNDICE A – Ficha estruturada para coleta de dados clínicos, imunohistoquímicos e moleculares	49
	ANEXO A – Folha de aprovação na Plataforma Brasil	50

1. INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) é um dos mais incidentes e de maior mortalidade no mundo para ambos os sexos. A estimativa mundial, para o ano de 2020, apontava mais de 1,9 milhão de casos novos de câncer de cólon e reto, correspondendo ao terceiro tumor mais incidente entre todos os cânceres. No Brasil, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o CCR ocupa a terceira posição, na população geral, entre os tipos de câncer mais frequentes no Brasil. ^{1,2,3,4}

O INCA estima, para 2023, 45.630 casos (21,10 casos por 100 mil habitantes), sendo 21.970 casos entre os homens e 23.660 casos entre as mulheres do país. A predisposição genética foi implicada em 2 a 8% de todos os CCRs. Extrapolando a estimativa, são aguardados, no Brasil, entre 2.280 e 4.500 casos de CCR com componente genético associado. ^{1,2,3,4}

Figura 1 – Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2023 por sexo, exceto pele não melanoma

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	71.730	30,0%	Homens		Mama feminina	73.610	30,1%
Cólon e reto	21.970	9,2%			Cólon e reto	23.660	9,7%
Traqueia, brônquio e pulmão	18.020	7,5%			Colo do útero	17.010	7,0%
Estômago	13.340	5,6%			Traqueia, brônquio e pulmão	14.540	6,0%
Cavidade oral	10.900	4,6%			Glândula tireoide	14.160	5,8%
Esôfago	8.200	3,4%			Estômago	8.140	3,3%
Bexiga	7.870	3,3%			Corpo do útero	7.840	3,2%
Laringe	6.570	2,7%			Ovário	7.310	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.420	2,7%			Pâncreas	5.690	2,3%
Fígado	6.390	2,7%			Linfoma não Hodgkin	5.620	2,3%

Fonte: INCA, 2023.

O CCR é uma doença multifatorial que se apresenta entre formas esporádicas, familiares e hereditárias. A caracterização de cada um deles nem sempre é clara, uma vez que a história familiar e as informações genéticas dos indivíduos disponíveis muitas vezes não são suficientes para fornecer as informações necessárias para esta diferenciação.^{2,5,6,7} Entretanto, o componente hereditário acontece em 1 a cada 5 daqueles diagnosticados com menos de 50 anos. Uma das formas hereditárias mais comuns é a síndrome de Lynch (SL), que pode corresponder entre 3 e 5% de todas as neoplasias colorretais. ^{2,5,6,7,8}

A forma esporádica da doença não apresenta um componente hereditário evidente, representa cerca de 70% dos casos de CCR, e é comum em pessoas com mais de 60 anos de idade. Nestes casos, as mutações somáticas são decorrentes, além dos efeitos da idade, da interação com o ambiente (exposição a substâncias carcinogênicas, hábitos de vida, radiações e nicotina), resultando em danos ao DNA.^{5,6,9,10}

Os principais fatores de risco associados a ascensão nas taxas de CCR estão relacionados ao comportamento, como sedentarismo; obesidade; consumo regular de álcool e tabaco; baixo consumo de fibras, frutas, vegetais e carnes magra; além da falta de programas de rastreio.^{2,4,5} Pacientes com IMC ≥ 30 possuem aumento do risco relativo de CCR a cada elevação de 1.07 no valor do IMC, decorrente dos efeitos epigenéticos ocasionados pela inflamação e estresses crônicos presentes na síndrome metabólica, interferindo na efetividade da ação das proteínas de reparo de DNA, inclusive naquelas que apresentam mutações no gene MMR (*Mismatch Repair gene* – genes reparadores de emparelhamento), principalmente em MLH1. Estudos recentes comprovaram a efetividade do tratamento da obesidade para redução de risco de CCR, incluindo a forma hereditária.^{11,12,13,14,15,16,17,18,19}

Existem três vias genéticas clássicas na patogênese do CCR: instabilidade cromossômica (CIN), instabilidade de microssatélites (MSI) e o fenótipo metilador de ilhas CpG (CIMP). Estas vias estão correlacionadas e alguns tumores podem apresentar alterações em múltiplas vias.^{2,5,6,7} A MSI é a menos frequente, sendo característica dos cânceres hereditários (Síndrome de Lynch), mas pode também ocorrer em cerca de 15% dos tumores esporádicos.^{5,6,8,9,10}

Os microssatélites são sequências de DNA curtas e repetidas compostas de um a seis pares de nucleotídeos, sem papel para codificação de proteína, mas que tem seu papel na regulação dos processos metabólicos do DNA e da atividade gênica. Os microssatélites são distribuídos por todo o genoma humano, e os *loci* de repetição individuais geralmente variam em comprimento de um indivíduo para outro. Devido a sua estrutura, a região de microssatélites é particularmente propensa a erros de replicação, normalmente corrigido pelo sistema de reparo de DNA (MMR).

Os genes de reparo de incompatibilidade (MMR) estão envolvidos em várias funções celulares, incluindo reparo de erros de síntese de DNA e apoptose. Essas

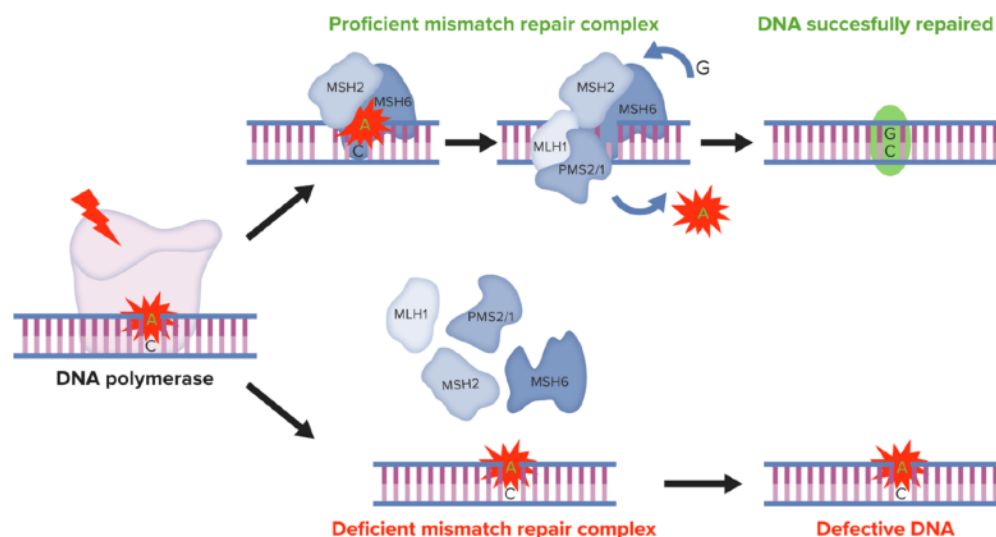
genes de reparo MMR - MLH1 (mutL homolog 1), MSH2 (mutS homolog 2), MSH6 (mutS homolog 6), PMS2 (postmeiotic segregation increased 2) ou deleção em EpCAM, no qual as deleções induzem o silenciamento epigenético de MSH2. A SL resulta da falha no processo de revisão que corrige incompatibilidades de pares de bases que surgem no curso normal da replicação do DNA. ^{22,23,24,25,26}

A prevalência populacional de defeito no gene MMR é estimada em 1:279 pessoas, assemelhando-se às variantes germinativas BRCA1/2. Dentre as proteínas MMR, há maior prevalência de variantes patogênicas em PMS2 (1:714), MSH6 (1:758), MLH1 (1:1946) e MSH2 (1:2841). A penetrância variável justifica a maior incidência de CCR entre os menos prevalentes (MLH1 e MSH2), visto que há menor penetrância em MSH6 e PMS2. ^{22,27,28}

As proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) atuam na remoção da sequência de DNA que carrega a incompatibilidade e, então, ligam o DNA reparado. O complexo MSH2/MSH6 é capaz de reconhecer incompatibilidades no DNA devido à substituição, inserção ou deleção de uma única base, enquanto a proteína do MLH1 dimeriza com o produto proteico de PMS2 para coordenar a ligação das proteínas envolvidas no reparo do DNA defeituoso ^{23,24,25,26,29}

Quando a funcionalidade das proteínas MMR encontra-se diminuída ou ausente, há uma diminuição na apoptose e aumento da oncogênese induzida pelo dano, promovendo crescimento seletivo e aumento na sobrevivência celular das células defeituosas. A fisiopatologia comumente relacionada ao mecanismo oncogenético na Síndrome de Lynch encontra-se no surgimento inicial dos pólipos semelhante ao CCR esporádico seguido de rápido crescimento para câncer invasivo decorrente da perda bialélica da função do gene MMR, ocasionando aumento das mutações somáticas na região dos microssatélites, acarretando a instabilidade de microssatélites. Portanto, a ausência da proteína de reparo encontra-se associada ao aumento do tamanho do pólipo. Este fato sugere que pólipos pequenos e, presumivelmente, precoces ainda não atingiram o "momento de indução" da apresentação da deficiência da proteína MMR. ^{22,27,29,30,31,32,33}

Figura 3– Atuação dos dímeros de proteínas MMR no reparo do DNA



Fonte: Moon C, 2021.

Em outros estudos, foram encontrados focos de criptas intestinais histologicamente normais com expressão ausente de proteínas MMR adjacentes a adenomas, sugerindo um papel das proteínas de reparo do DNA na oncogênese devido a atuação direta das mutações somáticas nos focos de criptas intestinais com defeito no gene MMR, promovendo o crescimento invasivo imediato do CCR, o que explicaria as neoplasias de intervalo entre colonoscopias de triagem com pouco espaçamento de tempo entre elas, além da tendência do surgimento de adenomas planos (LST ou lesões de espraiamento lateral) ao invés do padrão típico de adenomas sésseis ou polipóides. 22,25,29,30,31,32,33

A SL possui como características: alta instabilidade de microssatélites, que ocasiona uma rápida progressão adenoma-carcinoma (entre 1 a 3 anos) desencadeando um aumento do risco de CCR em comparação com a neoplasia colônica hereditária (progressão entre 8 a 17 anos); tumores com surgimento preferencial em cólon direito (60-70%), de forma mais precoce (por volta dos 45 anos de idade) e com taxa aumentada de tumores metacrônicos e sincrônicos (20%); presença de tumores extracolônicos, como endométrio, ovário, estômago, intestino delgado e trato urinário, em pacientes portadores da mutação germinativa. 6,9,34,35,36

Em decorrência da ausência de sinais clínicos que possam prever a suscetibilidade a SL, a história familiar tem sido o método principal em identificar

pacientes de risco. Nos países em desenvolvimento, os baixos orçamentos tornam o uso da história familiar (HF) importante para a triagem dos pacientes oncológicos para as formas hereditárias, por ser uma estratégia de baixo custo e uma ferramenta de avaliação de risco. A limitação desta forma de rastreio se encontra em reconhecer a predisposição hereditária ao CCR pela população geral e entre médicos em todos os níveis de atenção à saúde. ^{3,8,10,34,36,37}

Desse modo, a literatura fornece alguns parâmetros para identificação clínica de SL, sendo um deles conhecido como critérios de Amsterdam II, chamado também de Amsterdam modificado, que corresponde a: ^{1,5,10,22}

1. Três ou mais parentes com confirmação histológica de neoplasia associada a SL (CCR ou câncer de endométrio, estômago, intestino delgado, hepatobiliares, ureter ou pelve renal), um paciente acometido deve ser parente de primeiro grau dos outros dois; Polipose Adenomatosa Familiar excluída em qualquer dos casos de CCR.
2. Duas ou mais gerações sucessivamente acometidas;
3. Um ou mais indivíduo afetado com diagnóstico em idade inferior a 50 anos.

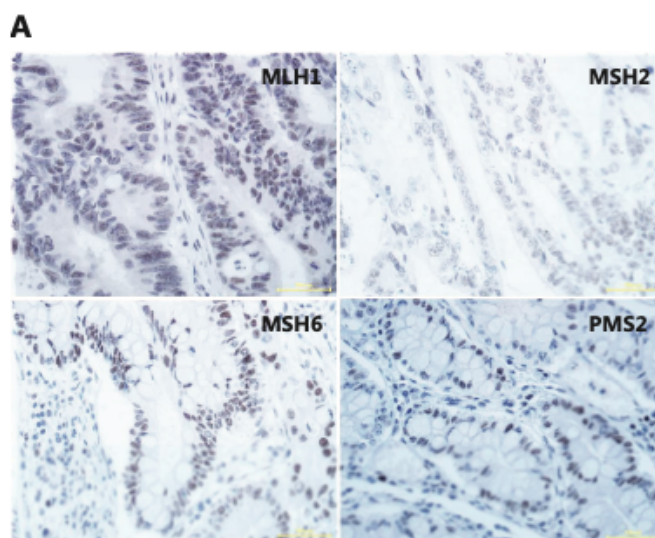
Os pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam II (AM) devem ser testados para identificar defeitos nas proteínas MMR no intuito de caracterizar SL. Defeitos no sistema MMR levam a acúmulo de erros nos microssatélites. Essas regiões podem ser utilizadas como um biomarcador para avaliar a perda de atividade do sistema MMR em células tumorais. As formas de análise mais utilizadas para análise são Instabilidade de Microssatélite (MSI) e Imunohistoquímica (IHQ) das proteínas MMR. ^{7,22,28,38,39,40,41}

A IHQ é utilizada para avaliar diretamente a expressão das quatro proteínas MMR mais relevantes (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2). A ausência de expressão de proteína no tecido tumoral é uma alternativa rápida, reprodutível e altamente específica e sensível para MSI, e tem a vantagem de sugerir qual gene ou genes podem ser defeituosos. Tumores que demonstram uma coloração ausente para qualquer uma dessas quatro proteínas são considerados como tendo disfunção nas proteínas MMR do DNA como resultado de mecanismo epigenético, somático e/ou germinativo de inativação genética. ^{22,28,42,43,44}

Tumores com mutações ou metilação no gene MLH1 geralmente apresentam ausência de expressão de MLH1 e PMS2, porque a estabilidade de PMS2 depende

da capacidade de formar um complexo com MLH1. Da mesma forma, um tumor com MSH2 defeituoso geralmente mostra ausência de expressão para MSH2 e MSH6. Quando os defeitos ocorrem em MSH6 ou PMS2, a ausência de expressão ocorre de forma isolada. No entanto, a sensibilidade da IHQ para MMR é limitada pelas características tumorais, pelas características de desempenho de diferentes anticorpos e pela possibilidade de que algumas variantes patogênicas nos genes MMR possam resultar em proteínas funcionalmente inativas, mas antigenicamente intactas. 42, 43, 44, 45, 46,47

Figura 4 - Investigação positiva através da IHQ em MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2



Fonte: Li Y, 2022.

Essa instabilidade genômica (instabilidade de microssatélites) representa uma característica marcante da Síndrome de Lynch. Devido às alterações nos genes MMR, os portadores da SL podem não apresentar a expressão da proteína MMR correspondente na avaliação por IHQ. O teste de IHQ no tumor colorretal tem uma sensibilidade e especificidade de 94% e 88%, respectivamente, e é altamente correlacionado com o status MSI. Estima-se que 50% das mutações na SL encontram-se em MLH1, 40% no gene MSH2, 7% -10% no gene MSH6, 5% no gene PMS2 e 1-3% EPCAM. Mutações no MSH2 levam a um risco significativamente aumentado de neoplasia extra-colônica. 4,5,9,10,22,28

Aproximadamente 15% dos tumores colorretais esporádicos, apresentam MSI devido a inativação na função do MLH1 por metilação na região promotora da

proteína. A comprovação da hipermetilação pode ser realizada diretamente através do teste na região promotora em MHL1, com alto custo envolvido, ou, de forma indireta, através da avaliação da mutação *BRAF V600E*, que está intimamente associada a metilação somática em MLH1. A presença da mutação em *BRAF* sugere câncer colorretal esporádico entre 80-90% dos casos.^{9,28,41,48}

A IHQ sempre foi reconhecida como melhor programa para rastreio de SL, em relação a custo-efetividade. Alguns estudos demonstram que o critério de seleção mais rígido (Amsterdam II) apresentou maior probabilidade de identificar alterações na linhagem germinativa quando comparado com o uso do critério Bethesda. No entanto, em uma população geral, os critérios de Amsterdam estão associados a baixa sensibilidade (28 - 45%) e especificidade (46 - 68%%) para diagnóstico através de IHQ.^{22,38,39,40,41}

A evolução na compreensão da base genética do câncer, composto por alterações cumulativas no genoma das células somáticas, foi decorrente do progresso na tecnologia de sequenciamento de DNA. Este processo está redesenhando o grau de entendimento do tumor, movendo-o de um fundamento histológico para um fundamento genético.^{48,49,50}

O diagnóstico molecular de Síndrome de Lynch era realizado por meio da técnica de sequenciamento Sanger. Entretanto, limitações desta técnica a tornam menos custo-efetiva, devido a sua reduzida capacidade de geração de dados. Tais dificuldades impediam a incorporação do diagnóstico gênico de Lynch na prática clínica, principalmente por ser uma técnica laboriosa e dispendiosa.^{8,38,40,41}

As abordagens de sequenciamento de nova geração (NGS) são mais sensíveis do que os métodos de Sanger e podem detectar mutações somáticas mesmo quando estão presentes apenas em um subconjunto de células tumorais. Além disso, essas novas estratégias de sequenciamento são quantitativas e podem ser usadas para determinar simultaneamente a sequência de nucleotídeos e variações no número de cópias.^{48,49,50,51,52}

O sequenciamento completo do genoma do câncer tem um enorme potencial para detectar todos os principais tipos de mutações somáticas presentes em tumores malignos. Esse amplo repertório de anormalidades genômicas inclui alterações de nucleotídeos únicos, pequenas inserções e deleções, grandes reorganizações cromossômicas e variações no número de cópias.^{49,53,54}

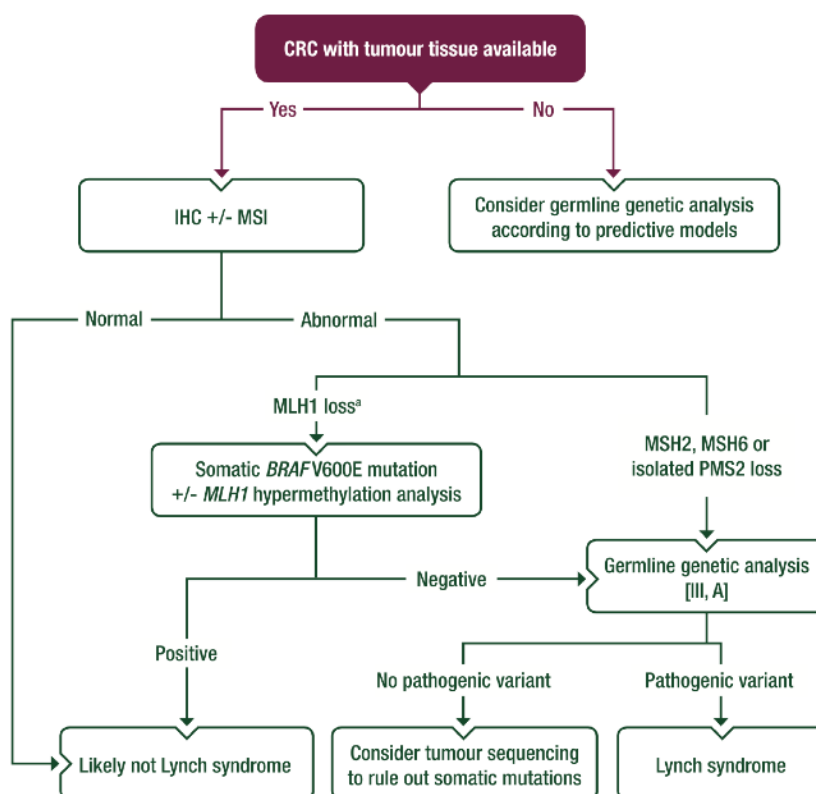
Os métodos atuais de preparação envolvem primeiro o corte aleatório do DNA genômico em fragmentos menores, sendo separados em pares. Em seguida, cada cadeia de DNA é amplificada por reação de polimerase em cadeia (PCR) para preparar um molde a ser analisado. Uma vez preparados, os moldes são fixados a uma superfície sólida em locais separados espacialmente, permitindo que milhares a bilhões de reações de sequenciamento de nucleotídeos sejam realizadas simultaneamente. Por fim, a extraordinária quantidade de dados liberados dessas plataformas de sequenciamento de nucleotídeos é armazenada, montada e analisada usando poderosas ferramentas bioinformáticas desenvolvidas em paralelo com a tecnologia NGS.^{48,54,55,56,57}

A utilização do NGS para o diagnóstico de câncer hereditário aumentou dramaticamente nos últimos 4 anos devido a capacidade aumentada de geração de dados, tornando-o mais atrativo e de melhor custo-benefício, devido a uma redução de mais de 10.000 vezes nos custos de sequenciamento. O NGS confere, ainda, maior velocidade ao processo de obtenção de dados e detém a capacidade de realizar a leitura completa do gene, incluindo regiões promotoras e intrônicas. Por isto, torna a leitura mais ampla e informativa, sem desconsiderar aspectos qualitativos.^{59,60,61,62}

Especialmente desafiadora é a realização do diagnóstico definitivo dos pacientes portadores de SL, levando a peregrinações dentro do sistema de saúde, com grande atraso e consequente aumento de morbidade e mortalidade. Recomenda-se, em famílias candidatas a estudos genéticos, uma pré-seleção por meio de história familiar no intuito de aumentar o sucesso na descoberta de mutações em pacientes com SL, análise pela IHQ e no teste de mutações na linha germinativa, além de economizar tempo e custo nos estudos.^{62,63,64}

O teste genético germinativo pode ser considerado em pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam II, independentemente do status das proteínas MMR na IHQ, mesmo ao considerar limitações de sensibilidade e especificidade dos critérios clínicos, que levam a orientação de triagem molecular universal do CCR com IHQ (figura 4). Caso todos os critérios clínicos de Amsterdam II forem atendidos em conjunto com a perda da expressão da proteína MMR, a probabilidade de detectar uma mutação germinativa aumenta significativamente para aproximadamente 70% a 80%.^{41,48}

Figura 5 – Algoritmo para diagnóstico molecular de Síndrome de Lynch



Fonte: Stjepanovic N, 2019 (adaptado).

CRC: câncer colorretal; MSI: instabilidade de microsatélites.

Devido a maior utilização do NGS em diagnóstico genético de doenças complexas e de câncer hereditário, o custo dessa abordagem tem se tornado mais econômico, mesmo quando IHQ é usado para identificar proteínas ausentes, devido a sua maior sensibilidade e especificidade para identificar probandos da SL, além das recentes atualizações no prognóstico e tratamento guiados pelas características moleculares^{28,33,61,62}

Dados os fenótipos sobrepostos das síndromes de câncer de alta penetrância, juntamente com a sensibilidade limitada de usar apenas critérios clínicos, uma abordagem através do NGS para o diagnóstico da SL permite um diagnóstico mais preciso, diminuindo tempo e potencialmente reduzindo os custos de investigação no intuito de reduzir significativamente a incidência de tumores associados à SL e a taxa de mortalidade de familiares.^{48,65,66,67}

2. OBJETIVOS

GERAL: Avaliar a correlação da IHQ e sequenciamento NGS para diagnóstico de SL entre os pacientes que preenchem critérios clínicos de Amsterdam II

ESPECÍFICOS:

- 1) Comparar a aplicação da IHQ para proteínas MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2) para diagnóstico de Síndrome de Lynch dos pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam II;
- 2) Comparar a aplicação do NGS para diagnóstico de Síndrome de Lynch dos pacientes que preenchem os critérios de Amsterdam II;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Tipo e Local de estudo:

Trata-se de pesquisa observacional, transversal, com amostra constituída por pessoas com diagnóstico de CCR cadastradas no Programa de Câncer Hereditário do Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP). Estes pacientes foram selecionados para consulta ambulatorial no HCP com médico oncogeneticista para inclusão no “Projeto Genomas Raros: aplicação da genômica para o diagnóstico de doenças raras e do risco hereditário de câncer no Brasil, em serviços públicos de saúde”.

3.2. Critérios de inclusão:

Pacientes, de ambos os sexos, com idade entre 18 e 70 anos no momento do diagnóstico de câncer colorretal, cadastrados no “Projeto Genomas Raros: aplicação da genômica para o diagnóstico de doenças raras e do risco hereditário de câncer no Brasil, em serviços públicos de saúde” que preencham critérios clínicos de Amsterdam II para Síndrome de Lynch.

3.3. Critérios de exclusão:

- Casos de polipose adenomatosa familiar (PAF)
- Pacientes que não assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).
- Pacientes cadastrados no Programa de Câncer Hereditário sem contato efetivo (e-mail, ligação, mensagem por aplicativo, mensagem de texto ou telegrama) para inclusão no Projeto Genomas Raros.

3.4. Procedimentos Éticos

O início da pesquisa foi condicionado à aprovação deste protocolo pelo Comitê de Ética em Pesquisa. Todos os indivíduos, ou seus responsáveis, que aceitaram participar desse estudo assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com registro CAAE 43517921.8.0000.5205 / Número do Parecer (HCP): 4.596.155.

Submeteram-se a investigação diagnóstica, em todos os pacientes que preencheram os critérios clínicos de Amsterdam II para SL e que foram cadastrados no “Projeto Genomas Raros”, através da coleta com material específico de sangue periférico (5 mL de cada paciente) e envio, através de logística pré-determinada pelo projeto, ao Hospital Israelita Albert Einstein / PROADI-SUS no qual a extração de DNA genômico foi efetuada.

A investigação do diagnóstico específico consistiu na obtenção, em todos os pacientes diagnosticados com SL com critérios de Amsterdam II, dos seguintes materiais: (a) bloco de parafina contendo tumor colorretal – a partir de peça cirúrgica e, se possível, tecido colônico normal adjacente para análise imunohistoquímica; (b) DNA genômico extraído de sangue periférico; (c) dados clínicos e (d) heredograma de no mínimo três gerações.

Para a publicação dos resultados dessa pesquisa, foram respeitadas as normas da Resolução 466/2012 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Os procedimentos acima mencionados não implicam em risco à saúde dos pacientes. As informações pessoais e familiares foram armazenadas em conformidade com as normas de sigilo médico vigentes e não poderão ser utilizadas para propósitos diferentes dos que foram explicitamente estabelecidos.

Os benefícios advindos desta pesquisa são de ordem individual, para os indivíduos com SL e coletiva. De forma individual, o reconhecimento da etiologia permitiu o aconselhamento genético com estimativa de risco de recorrência específico. Além disso, o conhecimento do diagnóstico exato permitiu uma terapia adequada, com melhores desfechos no longo prazo. No âmbito coletivo, o benefício é o reconhecimento das especificidades da SL na população de Pernambuco no intuito de obter avanços contínuos para a aplicação de medicina de precisão e aprimorar os recursos oferecidos pelo SUS.

3.5. Procedimentos Técnicos

O exame de IHQ foi realizado no laboratório de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer de Pernambuco. A detecção dos produtos protéicos dos genes MSH2, MSH6, MLH1 e PMS2 pela técnica de imunohistoquímica foi realizada de acordo com o protocolo descrito por Kim et al (2003), utilizando os anticorpos monoclonais contra as proteínas MLH1 (Mouse Anti-MLH1 Clone 14, Zymed), MSH2

(Mouse Anti-MSH2 Clone FE11, Zymed), MSH6 (MOUSE Anti- MSH6 Clone 44, Zymed) e PMS2 (Mouse Anti-PMS2 Clone A16-4, BD Pharmingen).²⁴

O tecido normal adjacente ao tumor foi utilizado como controle positivo. Coloração nuclear positiva foi definida como: (i) Padrão 1: <5% de coloração nuclear; (ii) Padrão 2: $\geq 5\%$ $\leq 10\%$ de coloração nuclear; (iii) Padrão 3: >10% de coloração nuclear. Expressão negativa da proteína definida pela completa ausência de coloração nuclear no tecido tumoral (Padrão 4, denominado de “lost”). As lâminas de IHQ foram analisadas por médicos patologistas.

A extração de DNA genômico foi efetuada a partir de uma amostra de 5 ml de sangue periférico de cada paciente, coletada em EDTA utilizando o kit fornecido pelo Hospital Israelita Albert Einstein / PROADI-SUS. O DNA foi extraído no Hospital Israelita Albert Einstein e submetido a sequenciamento de nova geração na plataforma Illumina, após fragmentação mecânica e um protocolo PCR-free. Os dados foram processados para chamada de variantes (SNVs, pequenas indels) e análise de número de cópias (CNV) para grandes deleções e duplicações exônicas no Pipeline Genomika-Einstein. A cobertura média esperada é de acima de 99% das bases com profundidade acima de 30x nos exons e 5pb de região intrônica adjacente, além de outras regiões não-codificantes específicas conhecidamente causadoras de fenótipos clínicos relevantes até o momento do desenho do ensaio. Genes com cobertura inferior a 98% são devidamente informados na seção de genes analisados. A numeração da variante foi realizada através do transcrito de referência a partir da base A do códon de iniciação ATG alinhado contra o genoma de referência GRCh38/hg38. A classificação de variantes foi efetuada de acordo com os critérios do Colégio Americano de Genômica e Genética Clínica (ACMG) e seguindo as atualizações do work group do ClinGen.

3.6. Amostra:

Amostra constituída por 217 famílias com diagnóstico de CCR cadastradas no Programa de Câncer Hereditário do Hospital de Câncer de Pernambuco. Dentre estes pacientes, foram selecionados 40 casos no qual foi possível a identificação de critérios de Amsterdam II para Síndrome de Lynch. Estes pacientes foram selecionados para consulta ambulatorial com médico oncogeneticista para inclusão no “Projeto Genomas Raros: aplicação da genômica para o diagnóstico de doenças

raras e do risco hereditário de câncer no Brasil, em serviços públicos de saúde”, no qual foi possível a confirmação dos critérios clínicos de Amsterdam II para Síndrome de Lynch, seguido da aplicação do TCLE e coleta de sangue periférico para envio para análise no Hospital Israelita Albert Einstein / PROADI-SUS, no qual a extração de DNA genômico foi efetuada.

Dentre os 40 pacientes selecionados inicialmente, não foi possível estabelecer contato em oito casos; em seis, os pacientes não preencheram o TCLE ou não quiseram participar da pesquisa; em seis casos, há resultados de NGS pendentes, devido a imprevisto prolongamento da entrega de resultado do sequenciamento genético.

3.7. Testes estatísticos usados:

Para analisar os dados, foram utilizadas as técnicas de estatística descritiva e de estatística inferencial. As técnicas de estatística descritiva envolveram as distribuições absolutas, percentuais, as medidas estatísticas: média, desvio padrão e coeficiente de variação. As variáveis numéricas estão representadas pelas medidas de tendência central e medidas de dispersão. As técnicas de estatística inferencial corresponderam aos testes estatísticos: teste exato de Fisher para variáveis categóricas e Teste t Student para dados pareados.

A verificação da hipótese de normalidade dos dados foi realizada através do teste de Shapiro-Wilk para variáveis quantitativas. Ressalta-se que a escolha dos testes Exato de Fisher para variáveis categóricas e Teste t Student (Distribuição Normal) para dados pareados foi devido ao número de observações e a verificação da hipótese de normalidade das variáveis de interesse (MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2), com os respectivos intervalos de confiança de 95%.

A concordância entre a IHQ e NGS em pacientes com SL que preenchem critérios de Amsterdam II foi avaliada de acordo com o índice de Kappa, conforme quadro abaixo.

Quadro 1 - Interpretação dos valores de Kappa

Values of Kappa	Interpretation
<0	Sem acordo
0-0.19	Correlação Ruim
0.20-0.39	Correlação Mediana/ Razoável
0.40-0.59	Correlação Moderada
0.60-0.79	Correlação Substancial
0.80-1.00	Correlação Quase Perfeita

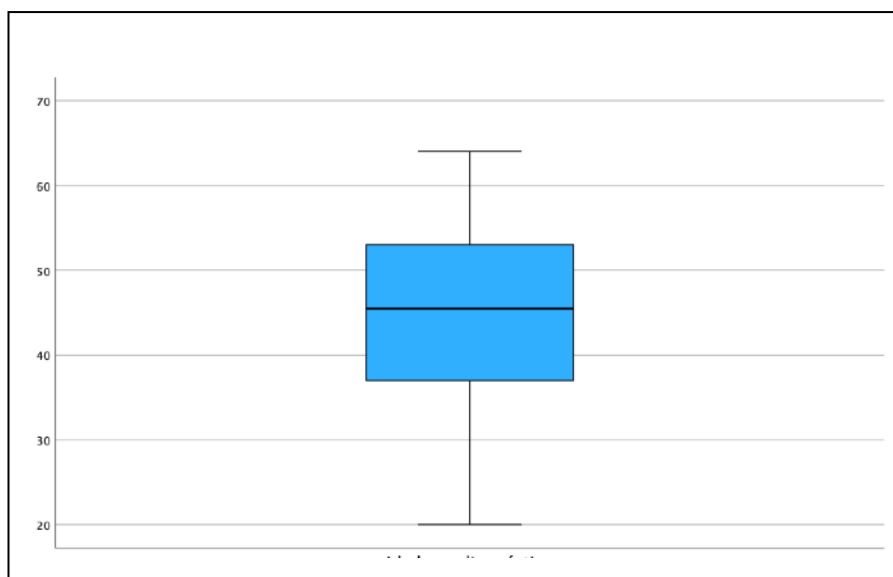
Fonte (adaptado): Landis JR, Koch GG. *The measurement of observer agreement for categorical data*. Biometrics 1977; **33**: 159-174

Os resultados estão apresentados em forma de tabelas e figuras com suas respectivas frequência absoluta e relativa. A margem de erro utilizada nas decisões dos testes estatísticos foi de 5%. O programa eleito para digitação dos dados e obtenção dos cálculos estatísticos foi o SPSS® (Statistical Package for the Social Sciences) na versão 29.0 para macOS e Excel 365.

4. RESULTADOS

Foram avaliados 20 pacientes com o resultado da IHQ e NGS. A idade média, no momento do diagnóstico do câncer colorretal, foi de 46 anos, variando entre 20 (idade mínima) e 64 anos (idade máxima), com desvio-padrão $\pm 11,1$ anos.

Figura 6 – Idade (em anos) ao diagnóstico do câncer colorretal



Em relação a distribuição conforme o gênero, há maior frequência de câncer colorretal entre a população feminina (65%), conforme tabela 1.

Tabela 1 – Distribuição da frequência conforme gênero.

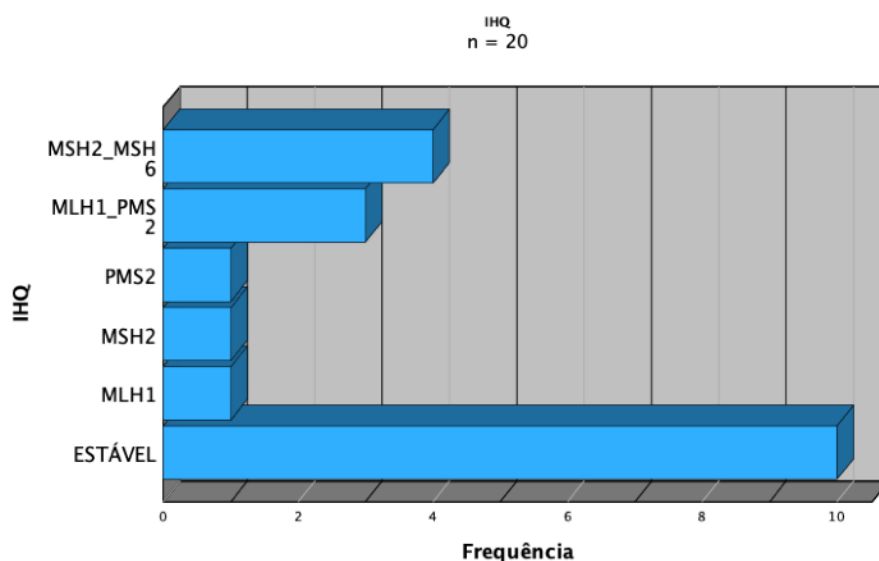
Gênero	Frequência	Porcentagem
Masculino	7	35
Feminino	13	65
Total	20	100.0

Em relação a avaliação imunohistoquímica do tecido tumoral, foram observados dez pacientes com presença de expressão das proteínas MMR (50%) e ausência de expressão da proteína MMR em 10 pacientes (50%), conforme tabela 2. Dentre os pacientes com ausência de expressão, em um caso foi observada em MLH1 (10%), um em MSH2 (10%), um em PMS2 (10%), além de ausência de expressão associadas entre MLH1 e PMS2 em três casos (30%) e quatro entre MSH2 e MSH6 (40%), de acordo com gráfico 1.

Tabela 2 – Distribuição da IHQ conforme frequência

IHQ	Frequência	Porcentagem
Presença de Expressão	10	50
Ausência de Expressão	10	50
Total	20	100.0

Gráfico 1 – Avaliação da IHQ do tecido tumoral



O sequenciamento genético (NGS) obteve 12 (60%) resultados negativos para Síndrome de Lynch dentre os pacientes que preenchem critérios clínicos de Amsterdam II. Dentre os oito resultados positivos para SL, em quatro deles foi encontrada variante patogênica em MLH1 e em quatro, variante patogênica em MSH2, conforme tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição do sequenciamento genético (NGS) conforme frequência.

NGS	Frequência	Porcentagem
Negativo	12	60
MLH1	4	20
MSH2	4	20
Total	20	100.0

Ao analisar a tabela 4, identificamos a presença de um valor de Kappa estatisticamente significativa. O coeficiente obtido foi de 0,510, indicando uma concordância moderada entre IHQ e NGS. Houve correlação entre IHQ e NGS em 14 casos, ocorrendo em 6 (30%) uma confirmação diagnóstica da IHQ pelo NGS e em 8 casos (40%), verificou-se uma exclusão diagnóstica de SL pela IHQ e NGS.

O valor preditivo positivo da IHQ foi de 60% e o valor preditivo negativo da IHQ foi de 80% em pacientes com critérios clínicos de Amsterdam II. A confirmação de SL através de NGS ocorreu em 8 casos (40%) com critérios clínicos de Amsterdam II. A análise também permitiu inferir que em 6 (30%) casos houve discordância entre IHQ e NGS, principalmente através da ausência das proteínas de reparo MMR (4 casos), mas com NGS sem identificação de variantes patogênicas nos genes MMR.

Tabela 4 – Correlação entre imunohistoquímica (IHQ) e sequenciamento genético (NGS).

Variáveis	IHQ		Kappa	p-valor Kappa
	Positivo	Negativo		
	n (%)	n (%)		
NGS				
Positivo	6 (30,0)	2 (10,0)	0,510	0,017
Negativo	4 (20,0)	8 (40,0)		

A tabela 5 permite a descrição da IHQ com presença das proteínas de reparo de DNA, na qual são observados dois casos (10%) em que ocorreu a confirmação de variante patogênica do gene MMR para SL, em MLH1. A análise da tabela 5 corrobora que, dentre os 10 pacientes com IHQ com ausência de expressão das proteínas MMR, em seis casos foram identificadas variantes patogênicas pelo NGS, sendo dois casos com ausência de expressão de MLH1 e quatro com ausência de expressão de MSH2.

Tabela 5 – Correlação entre as proteínas MMR na imunohistoquímica (IHQ) e genes MMR pelo sequenciamento genético (NGS).

		IHQ						Total
		Estável	MLH1	MSH2	PMS2	MLH1 + PMS2	MSH2 + MSH6	
NGS	Negativo	8 (40%)	0	1 (5%)	1 (5%)	2 (10%)	0	12 (60%)
	MLH1	2 (10%)	1 (5%)	0	0	1 (5%)	0	4 (20%)
	MSH2	0	0	0	0	0	4 (20%)	4 (20%)
Total		10 (50%)	1 (5%)	1 (5%)	1 (5%)	3 (15%)	4 (20%)	20 (100%)

Dentre os 10 pacientes com IHQ com ausência de expressão das proteínas MMR, em quatro casos não houve identificação de variantes patogênicas pelo NGS, sendo dois casos com ausência de MLH1/PMS2, um em PMS2 e um em MSH2. Conforme evidenciado no quadro 1, dentre estes 4 casos, em 2 foram observadas variantes de significado incerto (VUS), que irão requerer investigação adicional. Nos dois casos em que ocorreu a confirmação de variante patogênica do gene MMR para SL, em MLH1, com IHQ com presença da expressão das proteínas de reparo do DNA, ressalva-se que as variantes patogênicas são decorrentes da mesma grande deleção.

Quadro 2 – Relação entre IHQ e resultado do sequenciamento genético (NGS)

IHQ	NGS	Variante
Estável	MLH1	MLH1: Seq[GRCh38] del(3)(p22.1p22.2) NC_000003.12:g.(37047963_37059588)del
Estável	Negativo	-
Estável	Negativo	-
Estável	Negativo	-
MLH1	MLH1	MLH1: c.860del p. (Asn287Thrfs*10) Heterozigose
MLH1 PMS2	MLH1 (VUS)	MLH1 (VUS): c.4484G>T p.(Arg1495Met) Heterozigose + c.1731+3A>C p.(?) Heterozigose
MSH2 MSH6	MSH2 MSH6 (VUS)	MSH2: Seq (GRCh38) del (2)(p21p21) NC_000002.12:g.(47427877_47430683)del Heterozigose + MSH6 (VUS): c.253C>T p.(Pro85Ser) Heterozigose
MLH1 PMS2	MSH6 (VUS)	MSH6 (VUS): c.3598A>G p.(Ile1200Val) Heterozigose
MSH2 MSH6	MSH2 MSH6 (VUS)	MSH2: Seq[GRCh38] del(2)(p21p21) NC_000002.12:g.(47427877_47430683)del + MSH6 (VUS): c.3598A>G:p.(Ile1200Val)
Estável	Negativo	-
Estável	Negativo	-
MSH2 MSH6	MSH2 MSH6 (VUS)	MSH2: c.2181dup p.(Glu728*) Heterozigose + MSH6 (VUS): c.2752C>T p.(His918Tyr) Heterozigose
Estável	Negativo	-
MLH1 PMS2	MLH1	MLH1: c.2087delC (p.L697Sfs*83) no Exon 18 em heterozigose
Estável	Negativo	-
Estável	Negativo	-
PMS2	Negativo	-
Estável	MLH1	MLH1: Seq[GRCh38] del(3)(p22.2p22.2) NC_000003.12:g.(37047963_37059588)del
MSH2 MSH6	MSH2	MSH2: c.1787dup:p.(Asn596Lysfs*2)
MSH2	Negativo	-

5. DISCUSSÃO

A Síndrome de Lynch, distúrbio autossômico dominante, é a forma mais comum de CCR hereditário, com estimativa de 1 caso de SL a cada 35 diagnósticos de CCR, tendo incidência ligeiramente maior na população feminina. Em relação a distribuição conforme o gênero no estudo, há maior frequência de câncer colorretal entre a população feminina (13 casos / 65%) do que na masculina (7 casos / 35%), segundo a pesquisa atual, o que ratifica dados da literatura mundial e nacional tanto em relação a CCR quanto a SL.^{7,9,67,68,69,70,71}

Foram avaliados 20 pacientes no presente estudo, com idade média, no momento do diagnóstico do câncer colorretal, foi de 46 anos de idade, variando entre 20 anos (idade mínima) e 64 anos (idade máxima), o que corrobora a literatura, que define idade média entre 32 e 45 anos no diagnóstico de CCR, em portadores de SL, sendo o desenvolvimento mais precoce, entre 20 e 25 anos de idade, nas mutações em MLH1/MSH2, apresentando menor frequência de detecção de CCR em menores de 35 anos, na presença das mutações em MSH6/PMS2.^{6,48,65,69,70}

A seleção destes pacientes para teste genético ainda é um grande problema. Os critérios clínicos utilizados demonstram baixa sensibilidade, podendo deixar sem diagnóstico entre 39 - 50% dos casos.^{5,19,20} A Síndrome de Lynch é caracterizada por mutações germinativas heterozigóticas em genes MMR (MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 ou EPCAM), reduzindo a capacidade de reparo de pares de bases incompatíveis durante a divisão celular, predispondo ao desenvolvimento de câncer ao longo da vida. Há uma estimativa populacional de 1 caso de alteração (patogênica ou não-patogênica) em qualquer proteína MMR a cada 279 pessoas.^{6,22,72,73}

A ausência de expressão de MLH1 e MSH2 representa aproximadamente 70% dos casos de síndrome de Lynch identificados por IHQ. No estudo realizado, em relação a IHQ em pacientes que preenchem critérios de Amsterdam II, observou-se dez casos (50%) com presença de expressão das proteínas MMR; quatro casos (20%) de ausência de expressão das proteínas MMR em MLH1 de forma isolada ou associado a PMS2; cinco casos (25%) em MSH2 de forma isolada ou associado a

MSH6 e um caso em PMS2 de forma isolada (5%). Houve uma correlação dos dados com a literatura, assim como a correlação das perdas de expressão na IHQ conjuntas em MSH2/MSH6 e MLH1/PMS2, visto que MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6 formam heterodímeros, correspondendo a conjuntos obrigatórios para atuação no processo de reparo. Perdas de expressão na IHQ em MLH1 resultam em perda entre MLH1 e PMS2, assim perda em MSH2 desencadeia a perda entre MSH2 e MSH6, no entanto, a mutação em MSH6 ou PMS2 desencadeia ausência de expressão de MSH6 ou PMS2 de forma isolada.^{22,28,72,73,74}

Figura 7 – Relação entre resultado IHQ e gene MMR com variante patogênica para Síndrome de Lynch

RESULTADO IHQ	GENE COM DEFEITO	CONTEXTO
Perda de MLH1 e PMS2	MLH1	LS ou esporádico
Perda de MSH2 e MSH6	MSH2	LS
Perda Isolada de MSH6	MSH6	LS
Perda Isolada de PMS2	PMS2 ^a	LS

^a Perda isolada do PMS2 pode estar relacionado a anormalidade do gene MLH1

No estudo atual entre os pacientes que preenchem critérios de Amsterdam II, 50% dos casos apresentam alterações nas proteínas de reparo do DNA, mas apenas 40% dos casos são caracterizados como SL pelo diagnóstico molecular. De acordo com os dados de estudos realizados em outros centros nacionais, pode ocorrer falha no diagnóstico entre 33% e 47% dos casos de SL que preenchem critérios de Amsterdam II. Dentre os oito casos positivos, há quatro casos de NGS com mutação em MLH1 (50%) e quatro casos (50%) com mutação em MSH2. Houve 12 casos sem confirmação diagnóstica de Síndrome de Lynch, conforme tabela 4. Conforme a literatura, dentre as mutações que envolvem o CCR associado a SL, 80 a 90% dos casos no Brasil envolvem mutação em MLH1 ou MSH2, estando presente em torno de 50% dos casos em MLH1 e, aproximadamente, 40% dos casos em MSH2, sendo 10-20% relacionado a MSH6 / PMS2. Em paciente que

preenchem critérios clínicos de Amsterdam II, há maior sensibilidade na mutação em MLH1 (97%).^{9,22,67,68,75,76,77}

Dentre os resultados disponíveis, a correlação entre os dois métodos diagnósticos avaliados (IHQ e NGS) pode ser estabelecida de forma moderada, estatisticamente significativa ($p = 0.017$), conforme tabela 4. Houve correlação entre IHQ e NGS em 14 casos, ocorrendo em 6 (30%) uma confirmação diagnóstica da IHQ pelo NGS. Com o advento do NGS, os testes para detecção de SL tornaram-se mais importantes para identificação dos pacientes, direcionar tratamento e para segregar membros da família para vigilância ativa, de forma mais efetiva, com diminuição progressiva dos custos.^{22,28,70,72,77,78}

Em 4 casos (20%), a IHQ demonstrou alteração nas proteínas MMR, na qual não foi encontrada uma variante patogênica pelo NGS. O valor preditivo positivo da IHQ, neste relato, foi de 60% e o valor preditivo negativo da IHQ foi de 80% em pacientes com critérios clínicos de Amsterdam II. Para avaliação das proteínas de reparo por IHQ, todas as quatro proteínas MMR devem ser testadas, com sensibilidade de 83% e especificidade de 89%, valor acima do que foi encontrado no presente relato. Embora a triagem dos tumores colorretais com IHQ apresente-se como ferramenta importante para identificar portadores de SL, sua eficácia é inerentemente limitada a indivíduos que foram afetados realmente pelo câncer, com amostra do tumor disponível.^{28,48,69,70,77,78}

Essas especificidades em relação à interpretação dos resultados de IHQ são de grande importância, já que tem uma repercussão prática em relação às estratégias usadas para o diagnóstico molecular, e devem ser avaliadas sempre com muita precaução.^{33,34} Portadores de CCR por SL têm risco aumentado para um segundo câncer primário nos seguintes sítios: endométrio, estômago, ovário, intestino delgado, ureter e pelve renal, vias biliares, cérebro e alguns tipos de tumores de pele. Estas lesões podem ser prevenidas ou detectadas precocemente se a condição de portador de SL for reconhecida. Há, também, risco aumentado para câncer em parentes de gerações próximas ao dos portadores de SL, que podem ser identificados precocemente no intuito de prevenir o CCR, por meio de colonoscopia precoce, além de vigilância intensiva para detectar ou prevenir os outros cânceres relacionados à SL.^{8,61,69,74}

Observando-se o quadro 1, há cinco casos de VUS: 4 em MSH6 e 1 em MLH1. Em relação a VUS, presentes em até 40% dos estudos por NGS, a variante geralmente abrange a substituição por aminoácido único, que, a priori, não podem ser classificadas como patogênica ou benigna. O status de VUS não permite a estratificação do probando e sua família como baixo ou alto risco. ^{22,28,48,70,79}

Estudos indicam uma incidência de VUS em 31% de resultados com MLH1, 28% em MSH2, 47% em MSH6 e 26% em PMS2. O presente relato corrobora, parcialmente, com os dados da literatura vigente. O caso portador de VUS em MLH1, ocorreu dentre os 4 casos sem correlação entre IHQ e NGS. Neste caso, a pesquisa da mutação somática para o *BRAF V600E* deverá ser realizada para afastar os casos de hipermetilação na região promotora, encontrada em aproximadamente 15% dos casos de cânceres do tipo esporádico. Em caso de resultado negativo, a Síndrome de Lynch será confirmada e poderá ser requerida a alteração da variante de significado incerto para patogênica, de acordo com os critérios do Colégio Americano de Genômica e Genética Clínica (ACMG). ^{22,28,48,70,79,80}

Apesar de trabalhos anteriores relatarem uma porcentagem mínima de 5% de casos da Síndrome de Lynch atribuídos ao MSH6, nesse trabalho não foi identificado nenhum indivíduo com mutação comprovadamente patogênica nesse gene. Esse resultado pode ser decorrente do tamanho amostral ou como relatado anteriormente, da maior prevalência de VUS em MSH6. Os critérios clínicos de Amsterdam, usados para identificação clínica de indivíduos com SL, parecem são ser adequados para identificar portadores de mutações em MSH6, visto que tumores com perda da expressão em MSH6 são explicados por MSH2, percebe-se que nem sempre a IHQ é suficiente para um direcionamento correto para posterior análise genética, principalmente para o gene MSH6, já que sua expressão é fortemente dependente de MSH2. ^{19,48,70,80}

Atualmente, duas abordagens principais estão disponíveis para identificar indivíduos e famílias com risco para SL: 1. Abordagem chamada de critério universal (todos os casos de câncer colorretal); 2. Abordagem alvo (baseada na idade ou critérios de história familiar em pacientes com risco aumentado), seguidos por confirmação com teste genético, visto que as anormalidade na IHQ são apenas

sugestivas de SL; para a confirmação diagnóstica é necessária a identificação da mutação no sequenciamento de genes.^{22,28,34,81}

Ainda que a estratégia universal seja custo-efetiva, ela poderá falhar em identificar casos onde mutações nos genes de reparo interrompam a sua função, mas não resulte em instabilidade de microssatélites, como visto nos casos de mutações em MSH6 ou quando resultados de IHQ são normais apesar de uma proteína MMR não funcionando (proteínas funcionalmente inativas, mas antigenicamente intactas).^{19,48,67,81}

Nos dois casos em que ocorreu a confirmação de variante patogênica do gene MMR para SL, em MLH1, com IHQ com presença da expressão das proteínas de reparo do DNA, ressalva-se que as variantes patogênicas são decorrentes da mesma grande deleção. Grandes estudos nacionais e internacionais recentes ressaltam que são encontradas variantes patogênicas da linhagem germinativa com hipermetilação MLH1 somática concomitante em 6% dos casos. Portanto, como demonstrado no nosso estudo com 10% dos diagnósticos por NGS, há a possibilidade de falha no diagnóstico de portadores da mutação germinativa do MLH1 quando a hipermetilação somática do MLH1 por IHQ é usada para descartar a SL.^{11,22,28,67,68,70,82.}

O cenário de testes complementares em série, iniciando com testes com menor sensibilidade e especificidade ocasionam um manejo inadequado desses pacientes, visto que há um retardo no diagnóstico definitivo e consequente aumento de morbidade e mortalidade relacionadas a estas doenças.^{22,32,34,36,37} O NGS permite um diagnóstico mais preciso, diminuição do custo total com a investigação genética e do tempo total da jornada diagnóstica. Além disso, o conhecimento do diagnóstico exato pode permitir uma terapia adequada, com melhores desfechos no longo prazo, permitindo uma medicina preventiva de precisão.^{10,11,41,48,69,74}

Diante disto, a avaliação da qualidade dos métodos diagnósticos da Síndrome de Lynch permite realizar uma comparação entre os critérios de Amsterdam II, IHQ e sequenciamento NGS. Neste estudo, a inclusão do sequenciamento completo de genoma na investigação de indivíduos com SL permitiu a complementação e expansão da política atual, aumentando a capacidade diagnóstica e permitindo avaliar a custo-efetividade dessa ferramenta em vários cenários para uso no SUS.

^{2,3,37,64,66,67,83}

6. CONCLUSÃO

A correlação entre os dois métodos diagnósticos utilizados (IHQ e NGS) pode ser estabelecida de forma moderada, indicada pelo coeficiente Kappa de 0,510, a partir da triagem por critérios clínicos de Amsterdam II.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Wolf AI, Buchanan AH, Farkas LM. Historical review of Lynch syndrome. *Journal of Coloproctology*. 2010; 33(2): 95-110.
2. Carneiro V., Ramalho M, Ferreira CO et al. Importance of a hereditary cancer program in brazilian northeast. *European Journal of Surgical Oncology*. 2019; 45 (2): 90.
3. Viana DV, Goes JRN, Coy CSR, Ayrizono MDS, Lima CSP, Lopes-Cendes I. Family history of cancer in Brazil: is it being used? *Familial Cancer*. 2008;7(3):229–32.
4. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativas de incidência: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2023. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//estimativa-2023.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2023.
5. Quintanilha LF, Souza LN, Sanches D, Demarco RS, Fukutani KF. The impact of cancer campaigns in Brazil: a Google Trends analysis. *Ecancermedicalscience*. 2019;13.
6. Rossi BM, Palmero EI, López-Kostner F, Sarroca C, Vaccaro CA. A survey of the clinicopathological and molecular characteristics of patients with suspected Lynch syndrome in Latin America. *BMC Cancer*. 2017; 17 (1): 623.
7. da Silva FC, Ferreira JRD, Torrezan GT, Figueiredo MCP, Santos EMM, Nakagawa WT, Brianese RC, de Oliveira LP, Begnani MD, Aguiar S, et al. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have Lynch syndrome. *PLoS One*. 2015;10:10.
8. Rossi BM, Sarroca C, Vaccaro C, Lopez F, Ashton-Prolla P, Ferreira Fde O, Santos EM. The development of the study of hereditary cancer in South America. *Genet Mol Biol*. 2016;39(2):166–7.
9. Valle L, de Voer RM, Goldberg Y, Sjursen W, Försti A, Ruiz-Ponte C, Caldés T, Garré P, Olsen MF, Nordling M, Castellvi-Bel S. Update on genetic predisposition to colorectal cancer and polyposis. *Molecular aspects of medicine*. 2019 Oct 1;69:10-26.
10. Boland CR, Lynch HT. The history of Lynch syndrome. *Familial cancer*. 2013; 12 (2): 145-157.

- 11.da Silva SI, Domingos TA, Kupper BE, De Brot L, Junior SA, Carraro DM, Torrezan GT. Amplicon-based NGS test for assessing MLH1 promoter methylation and its correlation with BRAF mutation in colorectal cancer patients. *Experimental and Molecular Pathology*. 2023 Feb 1;130:104855.
- 12.Movahedi M, Bishop DT, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, Eccles D, Evans DG, Maher ER, Bertario L, Bisgaard ML. Obesity, aspirin, and risk of colorectal cancer in carriers of hereditary colorectal cancer: a prospective investigation in the CAPP2 study. *Journal of Clinical Oncology*. 2015.
- 13.Burn J, Gerdes AM, Macrae F, Mecklin JP, Moeslein G, Olschwang S, Eccles D, Evans DG, Maher ER, Bertario L, Bisgaard ML. Long-term effect of aspirin on cancer risk in carriers of hereditary colorectal cancer: an analysis from the CAPP2 randomised controlled trial. *The Lancet*. 2011 Dec 17;378(9809):2081-7.
- 14.Ma Y, Yang Y, Wang F, Zhang P, Shi C, Zou Y, Qin H. Obesity and risk of colorectal cancer: a systematic review of prospective studies. *PloS one*. 2013 Jan 17;8(1):e53916.
- 15.Botma A, Nagengast FM, Braem MG, Hendriks JC, Kleibeuker JH, Vasen HF, Kampman E. Body mass index increases risk of colorectal adenomas in men with Lynch syndrome: the GEOLynch cohort study. *J Clin Oncol*. 2010 Oct 1;28(28):4346-53.
16. Win AK, Dowty JG, English DR, Campbell PT, Young JP, Winship I, Macrae FA, Lipton L, Parry S, Young GP, Buchanan DD. Body mass index in early adulthood and colorectal cancer risk for carriers and non-carriers of germline mutations in DNA mismatch repair genes. *British journal of cancer*. 2011 Jun;105(1):162-9.
- 17.Yehuda-Shnaidman E, Schwartz B. Mechanisms linking obesity, inflammation and altered metabolism to colon carcinogenesis. *obesity reviews*. 2012 Dec;13(12):1083-95.
- 18.Lazzeroni M, Bellerba F, Calvello M, Macrae F, Win AK, Jenkins M, Serrano D, Marabelli M, Cagnacci S, Tolva G, Macis D. A Meta-analysis of obesity and risk of colorectal cancer in patients with lynch syndrome: the impact of sex and genetics. *Nutrients*. 2021 May 20;13(5):1736.
19. Engel C, Ahadova A, Seppälä TT, Aretz S, Bigirwamungu-Bargeman M, Bläker H, Bucksch K, Büttner R, tot Nederveen WT, Endris V, Holinski-Feder E. Associations of pathogenic variants in MLH1, MSH2, and MSH6 with risk of colorectal

- adenomas and tumors and with somatic mutations in patients with Lynch syndrome. *Gastroenterology*. 2020 Apr 1;158(5):1326-33.
- 20.Geiersbach KB, Samowitz WS. Microsatellite instability and colorectal cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 2011 Oct;135(10):1269-77.
 - 21.Kunitomi H, Banno K, Yanokura M, Takeda T, Iijima M, Nakamura K, Iida M, Adachi M, Watanabe K, Matoba Y, Kobayashi Y. New use of microsatellite instability analysis in endometrial cancer. *Oncology letters*. 2017 Sep 1;14(3):3297-301.
 - 22.Nolano A, Medugno A, Trombetti S, Liccardo R, De Rosa M, Izzo P, Duraturo F. Hereditary Colorectal Cancer: State of the Art in Lynch Syndrome. *Cancers*. 2023 Jan;15(1):75.
 - 23.Li Z, Pearlman AH, Hsieh P. DNA mismatch repair and the DNA damage response. *DNA repair*. 2016 Feb 1;38:94-101.
 - 24.Pećina-Šlaus N, Kafka A, Salamon I, Bukovac A. Mismatch repair pathway, genome stability and cancer. *Frontiers in molecular biosciences*. 2020:122.
 - 25.De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology*. 2004 Jan 1;126(1):42-8.
 - 26.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. *The Journal of molecular diagnostics*. 2008 Jul 1;10(4):293-300.
 - 27.Biller LH, Syngal S, Yurgelun MB. Recent advances in Lynch syndrome. *Familial Cancer*. 2019 Apr 15;18:211-9.
 - 28.Yurgelun MB, Hampel H. Recent advances in lynch syndrome: diagnosis, treatment, and cancer prevention. *American Society of Clinical Oncology Educational Book*. 2018; 38: 101-109.
 - 29.Moon C, Gordon M, Moon D, Reynolds T. Microsatellite instability analysis (MSA) for bladder cancer: past history and future directions. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021 Nov 28;22(23):12864.
 - 30.Hampel H, Frankel WL, Martin E, Arnold M, Khanduja K, Kuebler P, Clendenning M, Sotamaa K, Prior T, Westman JA, Panescu J. Feasibility of screening for Lynch

- syndrome among patients with colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2008 Dec 12;26(35):5783.
31. Yurgelun MB, Kulke MH, Fuchs CS, Allen BA, Uno H, Hornick JL, Ukaegbu CI, Brais LK, McNamara PG, Mayer RJ, Schrag D. Cancer susceptibility gene mutations in individuals with colorectal cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2017 Apr 4;35(10):1086.
 32. Win AK, Jenkins MA, Dowty JG, Antoniou AC, Lee A, Giles GG, Buchanan DD, Clendenning M, Rosty C, Ahnen DJ, Thibodeau SN. Prevalence and Penetrance of Major Genes and Polygenes for Colorectal Cancer. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention*. 2017 Mar 1;26(3):404-12.
 33. Ahadova A, Gallon R, Gebert J, Ballhausen A, Endris V, Kirchner M, Stenzinger A, Burn J, von Knebel Doeberitz M, Bläker H, Kloor M. Three molecular pathways model colorectal carcinogenesis in Lynch syndrome. *International journal of cancer*. 2018 Jul 1;143(1):139-50.
 34. Campos FG, Figueiredo MN, Martinez CA. Current evidence for universal molecular testing for colorectal cancer patients. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*. 2017 Jul;37:174-8.
 35. De Jong AE, Morreau H, Van Puijenbroek M, Eilers PH, Wijnen J, Nagengast FM, Griffioen G, Cats A, Menko FH, Kleibeuker JH, Vasen HF. The role of mismatch repair gene defects in the development of adenomas in patients with HNPCC. *Gastroenterology*. 2004 Jan 1;126(1):42-8.
 36. Matos MB, Barbosa LE, Teixeira JP. Narrative review comparing the epidemiology, characteristics, and survival in sporadic colorectal carcinoma/Lynch syndrome. *Journal of Coloproctology (Rio de Janeiro)*. 2020 Mar 23;40:73-8.
 37. Ashton-Prolla P, Seuanez HN. The Brazilian hereditary cancer network: historical aspects and challenges for clinical cancer genetics in the public health care system in Brazil. *Genet Mol Biol*. 2016;39(2):163–5.
 38. Syngal S, Brand RE, Church JM, Giardiello FM, Hampel HL, Burt RW. ACG clinical guideline: genetic testing and management of hereditary gastrointestinal cancer syndromes. *The American journal of gastroenterology*. 2015; 110 (2): 223.
 39. Hajirawala L, Barton JS. Diagnosis and Management of Lynch Syndrome. *Diseases of the Colon & Rectum*. 2019; 62 (4): 403-405.

40. Wielandt Ana María, Zárate Alejandro J, Hurtado Claudia, Orellana Paulina, Álvarez Karin, Pinto Eliana et al . Lynch syndrome: selection of families by microsatellite instability and immunohistochemistry. *Rev. méd. Chile.* 2012; 140 (9): 1132-1139.
41. Stjepanovic N, Moreira L, Carneiro F, Balaguer F, Cervantes. Hereditary gastrointestinal cancers: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Annals of Oncology.* 2019; 30 (10): 1558-1571.
42. Gan C, Love C, Beshay V, Macrae F, Fox S, Waring P, Taylor G. Applicability of next generation sequencing technology in microsatellite instability testing. *Genes.* 2015 Feb 12;6(1):46-59.
43. Nowak JA, Yurgelun MB, Bruce JL, Rojas-Rudilla V, Hall DL, Shivdasani P, Garcia EP, Agoston AT, Srivastava A, Ogino S, Kuo FC. Detection of mismatch repair deficiency and microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma by targeted next-generation sequencing. *The Journal of Molecular Diagnostics.* 2017 Jan 1;19(1):84-91.
44. Salipante SJ, Scroggins SM, Hampel HL, Turner EH, Pritchard CC. Microsatellite instability detection by next generation sequencing. *Clinical chemistry.* 2014 Sep 1;60(9):1192-9.
45. Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clinical chemistry.* 2009 Apr 1;55(4):641-58.
46. Vasen HF, Blanco I, Aktan-Collan K, Gopie JP, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, Bertario L, Burn J, Capella G, Colas C. Revised guidelines for the clinical management of Lynch syndrome (HNPCC): recommendations by a group of European experts. *Gut.* 2013 Jun 1;62(6):812-23.
47. Giardiello FM, Allen JI, Axilbund JE, Boland CR, Burke CA, Burt RW, Church JM, Dornitz JA, Johnson DA, Kaltenbach T, Levin TR. Guidelines on genetic evaluation and management of Lynch syndrome: a consensus statement by the US Multi-Society Task Force on colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2014 Aug 1;147(2):502-26.
48. Lynch HT, Lanspa S, Shaw T, Casey MJ, Rendell M, Stacey M, Townley T, Snyder C, Hitchins M, Bailey-Wilson J. Phenotypic and genotypic heterogeneity of Lynch syndrome: a complex diagnostic challenge. *Familial cancer.* 2018 Jul;17:403-14

- 49.DeVita VT, Lawrence TS, Rosenberg SA. Cancer: Primer of the molecular biology of cancer: principles & practice of oncology. 2021.
- 50.Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nature medicine*. 2004 Aug 1;10(8):789-99.
- 51.Monahan KJ, Swinyard O, Latchford A. Biology of Precancers and Opportunities for Cancer Interception: Lesson from Colorectal Cancer Susceptibility Syndromes. *Cancer Prevention Research*. 2023 Apr 17:OF1-7.
- 52.Meyerson M, Gabriel S, Getz G. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*. 2010 Oct;11(10):685-96.
- 53.Metzker ML. Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics*. 2010 Jan;11(1):31-46
- 54.Nakagawa H, Fujita M. Whole genome sequencing analysis for cancer genomics and precision medicine. *Cancer science*. 2018 Mar;109(3):513-22.
- 55.Bell DW. Our changing view of the genomic landscape of cancer. *The Journal of Pathology: A Journal of the Pathological Society of Great Britain and Ireland*. 2010 Jan;220(2):231-43.
- 56.Morozova O, Hirst M, Marra MA. Applications of new sequencing technologies for transcriptome analysis. *Annual review of genomics and human genetics*. 2009 Sep 22;10:135-51.
- 57.Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz Jr LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013 Mar 29;339(6127):1546-58.
- 58.Tran E, Ahmadzadeh M, Lu YC, Gros A, Turcotte S, Robbins PF, Gartner JJ, Zheng Z, Li YF, Ray S, Wunderlich JR. Immunogenicity of somatic mutations in human gastrointestinal cancers. *Science*. 2015 Dec 11;350(6266):1387-90.
- 59.Espenschied CR, LaDuca H, Li S, McFarland R, Gau CL, Hampel H. Multigene panel testing provides a new perspective on Lynch syndrome. *J Clin Oncol*. 2017; 35 (22): 2568-2575.
- 60.Chambuso R, Robertson B, Ramesar R. A Scoring Model and Protocol to Adapt Universal Screening for Lynch Syndrome to Identify Germline Pathogenic Variants by Next Generation Sequencing from Colorectal Cancer Patients and Cascade Screening. *Cancers*. 2022 Jun 12;14(12):2901.

61. Gallego CJ, Shirts BH, Bennette CS, Guzauskas G, Amendola LM. Next-generation sequencing panels for the diagnosis of colorectal cancer and polyposis syndromes: a cost-effectiveness analysis. *Journal of Clinical Oncology*. 2015; 33 (18): 2084.
62. Hampel H, Pearlman R, Beightol M, Zhao W, Jones D. Assessment of tumor sequencing as a replacement for Lynch syndrome screening and current molecular tests for patients with colorectal cancer. *JAMA oncology*. 2018; 4(6): 806-813.
63. Kašubová I, Holubeková V, Janíková K, Váňová B, Šňahničanová Z. Next Generation Sequencing in Molecular Diagnosis of Lynch Syndrome—a Pilot Study Using New Stratification Criteria. *Acta Medica (Hradec Králové)*. 2018; 61(3): 98-102.
64. Kozak VN, de Souza Fonseca Ribeiro EM, Kozonoe MM, Ioshii SO, Casali da Rocha JC. When guidelines face reality—Lynch syndrome screening in the setting of public health system in a developing country. *Journal of Community Genetics*. 2022 Feb;13(1):19-29.
65. Sinicrope FA. Lynch syndrome—associated colorectal cancer. *New England Journal of Medicine*. 2018; 379 (8): 764-773.
66. Carneiro da Silva F, Ferreira JR, Torrezan GT, Figueiredo MC, Santos ÉM, Nakagawa WT, Brianese RC, Petrolini de Oliveira L, Begnani MD, Aguiar-Junior S, Rossi BM. Clinical and molecular characterization of Brazilian patients suspected to have Lynch syndrome. *PLoS One*. 2015 Oct 5;10(10):e0139753.
67. de Paula AE, Galvão HD, Bonatelli M, Sabato C, Fernandes GC, Berardinelli GN, Andrade CE, Neto MC, Romagnolo LG, Campacci N, Scapulatempo-Neto C. Clinicopathological and molecular characterization of Brazilian families at risk for Lynch syndrome. *Cancer Genetics*. 2021 Jun 1;254:82-91.
68. de Oliveira JM, Zurro NB, Coelho AV, Caraciolo MP, de Alexandre RB, Cervato MC, Minillo RM, de Vasconcelos Carvalho Neto G, Grivicich I, Oliveira JB. The genetics of hereditary cancer risk syndromes in Brazil: a comprehensive analysis of 1682 patients. *European Journal of Human Genetics*. 2022 Jul;30(7):818-23.
69. Cohen SA, Pritchard CC, Jarvik GP. Lynch syndrome: from screening to diagnosis to treatment in the era of modern molecular oncology. *Annual review of genomics and human genetics*. 2019; 20: 293-307.

- 70.Li Y, Fan L, Zheng J, Nie X, Sun Y, Feng Q, Lian S, Bai W, Cai W, Yang Y, Su B. Lynch syndrome pre-screening and comprehensive characterization in a multi-center large cohort of Chinese patients with colorectal cancer. *Cancer Biology & Medicine*. 2022 Jun 1.
- 71.de Oliveira Santos M, de Lima FC, Martins LF, Oliveira JF, de Almeida LM, de Camargo Cancela M. Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2023 Feb 6;69(1).
- 72.Palomaki GE, McClain MR, Melillo S, Hampel HL, Thibodeau SN. EGAPP supplementary evidence review: DNA testing strategies aimed at reducing morbidity and mortality from Lynch syndrome. **Genetics in Medicine**. 2009; 11 (1): 42-65.
- 73.Kohlmann W, Gruber S. Lynch Syndrome GeneReview: Microsatellite Instability (MSI) Testing. 2018.
- 74.Peltomäki P. Update on Lynch syndrome genomics. *Familial cancer*. 2016; 15 (3): 385-393.
- 75.Rossi BM, Lopes A, Oliveira Ferreira F, Nakagawa WT, Napoli Ferreira CC. Casali Da Rocha JC, Simpson CC, Simpson AJ: hMLH1 and hMSH2 gene mutation in Brazilian families with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Ann Surg Oncol*. 2002;9(6):555–61.
- 76.Berardinelli GN, Duraes R, Mafra da Costa A, Bragagnoli A, Antônio de Oliveira M, Pereira R, Scapulatempo-Neto C, Guimaraes DP, Reis RM. Association of microsatellite instability (MSI) status with the 5-year outcome and genetic ancestry in a large Brazilian cohort of colorectal cancer. *European Journal of Human Genetics*. 2022 Jul;30(7):824-32.
- 77.ACMG Laboratory Quality Assurance Committee. Erratum to: ACMG technical standards and guidelines for genetic testing for inherited colorectal cancer (Lynch syndrome, familial adenomatous polyposis, and MYH-associated polyposis) (*Genetics in Medicine*,(2014), 16, 1,(101-116), 10.1038/gim. 2013.166). *Genetics in Medicine*. 2021 Oct;23(10):1807-17.
- 78.Take LJ. Targeted next-generation sequencing for hereditary cancer syndromes: a focus on lynch syndrome and associated endometrial cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2015; 17 (5): 472-482.

- 79.Lappalainen T., Scott A. J., Brandt M., & Hall I. M. Genomic analysis in the age of human genome sequencing. *Cell*. 2019; 177 (1): 70-84.
- 80.Sjursen W, Haukanes BI, Grindedal EM, Aarset H, Stormorken A, Engebretsen LF, Jonsrud C, Bjørnevoll I, Andresen PA, Ariansen S, Lavik LAS, Gilde B, Bowitz-Lothe IM, Mæhle L, Moller P. Current clinical criteria for Lynch syndrome are not sensitive enough to identify MSH6 mutation carriers. *J Med Genet* 2010; 9: 579–585.
- 81.Boland CR, Shike M Report from the Jerusalem workshop on Lynch syndrome-hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Gastroenterology*. 2010; 138:2197.e1–2197.e7
- 82.da Silva SI, Domingos TA, Kupper BE, De Brot L, Junior SA, Carraro DM, Torrezan GT. Amplicon-based NGS test for assessing MLH1 promoter methylation and its correlation with BRAF mutation in colorectal cancer patients. *Experimental and Molecular Pathology*. 2023 Feb 1;130:104855.
- 83.Monteiro Santos EM, Valentin MD, Carneiro F, de Oliveira LP, de Oliveira Ferreira F, Junior SA, Nakagawa WT, Gomy I, de Faria Ferraz VE, da Silva Junior WA, Carraro DM, Rossi BM. Predictive models for mutations in mismatch repair genes: implication for genetic counseling in developing countries. *BMC Cancer* 2012; 12:64.

APÊNDICE A – Ficha estruturada para coleta de dados clínicos, imunohistoquímicos e moleculares

Identificação:

Iniciais do nome do paciente:

Sexo:

Data de nascimento:

Idade ao diagnóstico da neoplasia:

Registro Hospitalar:

Heredograma (no mínimo três gerações):

Preenche critérios de Amsterdam II: () sim () não

LAUDO IHQ
Instabilidade microssatélites: () SIM () NÃO
Ausência de expressão de: () MLH1 () MSH2 () MSH6 () PMS2
LAUDO NGS
Descrição:

Anexo A – Folha de aprovação Plataforma Brasil

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação comparativa entre método de Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e imunohistoquímica (IHQ) no diagnóstico de Síndrome de Lynch em pacientes com critérios clínicos de Amsterdam II

Pesquisador: PAULO MOZART DE BARROS

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 43517921.8.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.596.155

Apresentação do Projeto:

O câncer colorretal (CCR) é um dos mais incidentes e de maior mortalidade no mundo para ambos os sexos, com forte componente genético. Uma das formas hereditárias mais comuns é a síndrome de Lynch (SL). SL é um distúrbio hereditário autossômico dominante causado por mutações da linha germinativa em um dos genes de reparo (MMR) - MLH1, MSH2, MSH6 ou PMS2. O início precoce da doença e múltiplos tumores com instabilidade de microssatélites (MSI) são típicos nos pacientes afetados. Os protocolos atuais sugerem, para o diagnóstico precoce, a triagem entre pacientes suspeitos de SL através de critérios clínicos seguido de teste de mutações nas proteínas MMR, utilizando a detecção de MSI e imunohistoquímica (IHQ) antes do teste genético. Todavia, o diagnóstico definitivo dos pacientes com suspeita de SL é desafiador, o que provoca verdadeiras peregrinações dentro do sistema de saúde, com grande atraso e consequente aumento de morbidade e mortalidade relacionadas a esta

doença. A realização do sequenciamento de próxima geração (NGS) permite a obtenção de dados de forma mais ampla e informativa, sem desconsiderar aspectos qualitativos, levando à diminuição do custo total e do tempo da jornada diagnóstica da SL. O presente projeto pretende avaliar a relação entre os critérios clínicos de Amsterdam II, a IHQ e o sequenciamento NGS como forma de determinar a acurácia deles na

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 4.596.155

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para Conhecimento da Síndrome de Lynch no Estado de Pernambuco e para comparação da acurácia do Sequenciamento NGS em relação à IHQ nos preenchedores de Amsterdam II.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Termos de Apresentação obrigatória presentes de maneira clara, explicativa, com rigor científico e de fácil entendimento.

Recomendações:

nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considero Projeto de Pesquisa aprovado sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

PROJETO APROVADO APÓS A REUNIÃO.

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da NOTIFICAÇÃO com o Relatório Final da Pesquisa. Eventuais modificações na Pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas, COMO DOCUMENTO ANEXO detalhado. Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador apresente a este CEP, relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP deve ser informado de todos os eventos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do pesquisador assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1704492.pdf	24/02/2021 09:45:37		Aceito
Outros	Ficha_de_coleta.pdf	24/02/2021	PAULO MOZART DE	Aceito

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br