

# CARCINOMA COLORECTAL FAMILIAR DE TIPO X

## Caracterização Clínica, Patológica e Molecular

Sara FERREIRA, Pedro LAGE, Rita SOUSA, Isabel CLARO, Inês FRANCISCO,  
Bruno FILIPE, Alexandra SUSPIRO, Paula CHAVES, Paula RODRIGUES,  
Cristina ALBUQUERQUE, C. NOBRE LEITÃO

### RESUMO

**Introdução:** Existem famílias nas quais, apesar de serem preenchidos os Critérios de Amsterdão (CA), os carcinomas do cólon ou recto (CCR) não apresentam instabilidade de microssatélites (IM) e não se identificam mutações germinais nos genes de reparação do ADN, contrariamente ao que acontece na Síndrome de Lynch (SL). Para estes casos, foi proposta a denominação de Carcinoma Colorectal Familiar de tipo X (SX), cuja base genética permanece por esclarecer.

**Objectivos:** Em famílias com CA para SL: 1) efectuar a pesquisa de IM em CCR, correlacioná-la com as características clínico-patológicas e com a análise mutacional nos genes de reparação do ADN; 2) nos casos sugestivos de SX, estudar a via supressora (VS) da carcinogénese.

**Doentes e métodos:** Incluídos 45 doentes com CCR, pertencentes a 41 famílias com CA. Avaliaram-se as características clínicas e patológicas das famílias/CCR. A pesquisa de IM foi efectuada com os marcadores de Bethesda e a análise mutacional nos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6* realizada por DGGE, MLPA e sequenciação directa. A VS foi avaliada através de perdas de heterozigotia (genes *APC*, *p53*, *DCC* e *SMAD4*).

**Resultados:** Detectaram-se CCR com IM de alto grau (IMA) em 33/41 (80%) famílias, sendo os restantes estáveis (EM). Nas famílias com suspeita de SX registou-se um menor número de casos de CCR e uma menor frequência de tumores extra-cólicos do espectro da SL. Comparativamente com os CCR com IMA, os com EM predominaram no cólon distal/recto e apresentaram numa menor percentagem produção de muco e infiltrado linfocitário péri-tumoral. Em 70% das famílias com CCR com IMA, identificaram-se mutações patogénicas nos genes de reparação do ADN e em nenhuma das com CCR com EM. A VS foi seguida em dois casos e uma via alternativa noutros dois. Os restantes quatro casos não foram informativos; contudo, 5/8 (63%) apresentaram perdas alélicas no gene *APC*. **Conclusões:** 1) As famílias com CA com CCR estáveis apresentaram características particulares, reforçando a existência de uma entidade diferente da SL; 2) A designação de Carcinoma Colorectal Familiar de tipo X parece adequada para uma entidade cuja via de carcinogénese não é clara e cuja base genética é actualmente desconhecida; 3) A designação de SL deve ser aplicada apenas a famílias com análise mutacional positiva para os genes de reparação do ADN.

S.F., P.L., R.S., I.C., C.N.L.:  
Serviço de Gastrenterologia.  
Instituto Português de Oncologia.  
Lisboa  
S.F., P.L., R.S., I.C., A.S., P.R.:  
Clínica de Risco Familiar. Instituto  
Português de Oncologia.  
Lisboa  
I.F., B.F., C.A., C.N.L.: Centro  
de Investigação de Patobiologia  
Molecular. Instituto Português  
de Oncologia. Lisboa  
P.C.: Serviço de Anatomia Patológica.  
Instituto Português de Oncologia.  
Lisboa

© 2009 CELOM

## SUMMARY

### FAMILIAL COLORECTAL CANCER TYPE X

#### Clinical, Pathological and Molecular Characterization

**Background:** Some families fulfilling the Amsterdam Criteria (AC) differ from the Lynch syndrome (LS) in that colorectal cancers (CRC) do not present microsatellite instability (MSI) and DNA mismatch repair gene mutations are not found. These families have been designated as Familial Colorectal Cancer type X (XS) and their genetic basis remains unknown.

**Aims:** In families fulfilling AC for LS: 1) To perform MSI testing in CRC and to correlate it with clinical and pathological characteristics and with the mutational analysis in the DNA mismatch repair genes; 2) In cases suggestive of XS, to study the suppressor pathway (SP) of carcinogenesis.

**Patients and methods:** 45 patients with CRC, from 41 families fulfilling AC, were included. Clinical and pathological data were recorded. MSI testing was performed with the Bethesda marker panel and mutational analysis in *MLH1*, *MSH2* and *MSH6* genes was undertaken by DGGE, MLPA and direct sequencing. To study the SP, loss of heterozygosity was evaluated at the following *loci*: *APC*, *p53*, *DCC* and *SMAD4* genes.

**Results:** 33/41 (80%) and 8/41 (20%) families presented high-grade microsatellite instability (MSI-H) and microsatellite stable (MSS) CRC, respectively. In families suggestive of XS, a smaller number of CRC and less frequent spectrum associated tumors were detected. In comparison with MSI-H CRC, MSS CRC were preferentially located at the distal colon/rectum and less often presented mucous production or lymphocytic infiltrate. In 70% of families with MSI-H CRC, a pathogenic mutation in one of the DNA mismatch repair genes was identified, as opposed to none in the group with MSS CRC. The SP was followed in 2 cases and an alternative one in other two. The remaining 4 cases were non-informative; however, 5/8 (63%) presented allelic losses in the *APC* gene.

**Conclusions:** 1) Families fulfilling AC and harbouring MSS CRC presented particular characteristics, which reinforce the existence of a new entity, different from LS; 2) The designation of Familial Colorectal Cancer type X seems appropriate to classify an entity whose CRC follow an unclear carcinogenesis pathway and that presents an unknown genetic basis; 3) The designation of LS should be restricted to families with an identified pathogenic DNA mismatch repair gene mutation.

## INTRODUÇÃO

A síndrome de Lynch (SL) é uma entidade com transmissão autossómica dominante, que se associa a um risco elevado de desenvolvimento de carcinomas do cólon ou recto (CCR). Estes tumores, que surgem preferencialmente em idade jovem, predominam em localização proximal e, do ponto de vista morfológico, apresentam mais frequentemente produção de muco e infiltrado linfocitário peritumoral<sup>1</sup>. 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<sup>2</sup>.

O diagnóstico clínico da SL baseia-se nos critérios de Amsterdão (CA), inicialmente publicados em 1991, com o objectivo de uniformizar a investigação clínica e básica em famílias cuja agregação de CCR sugeria a presença de uma síndrome hereditária<sup>3</sup>. Estes critérios foram revistos

em 1999, tendo passado a incluir tumores extra-cólicos do espectro<sup>4</sup>. Nestas famílias, existe indicação para a pesquisa de mutações germinais em determinados genes de reparação dos erros de replicação do ADN. Cerca de 90% de todas as mutações identificadas localizam-se nos genes *MLH1* e *MSH2*, sendo menos frequente o envolvimento dos genes *MSH6* e *PMS2*<sup>5</sup>.

O desenvolvimento de CCR resulta da acumulação de mutações em genes cruciais para o controlo do crescimento e diferenciação celulares<sup>6</sup>. Até à data, tem sido assumida a existência de duas vias principais de instabilidade genómica, aparentemente independentes: a via supressora (VS), caracterizada pela alteração sequencial de genes supressores tumorais e proto-oncogenes, cujos tumores apresentam instabilidade cromossómica, e a via mutadora (VM), caracterizada pela presença de mutações em genes de reparação do ADN, cujos tumores apresentam instabilidade de microsatélites (IM)<sup>7</sup>.

Cerca de 90% dos CCR associados à SL seguem a VM da carcinogénese, traduzida pela presença de IM de alto grau (IMA)<sup>8,9</sup>. No entanto, recentemente foram descritas famílias que preenchem os CA, mas cujos CCR não apresentam IM e em que não se identificam mutações nos genes de reparação do ADN. Lindor et al sugeriram denominar esta nova entidade como Carcinoma Colorectal Familiar de tipo X (*Síndrome X – SX –*, para efeitos de simplificação), uma vez que a sua base genética permanece por esclarecer<sup>10</sup>. Com o objectivo de evitar qualquer associação com a expressão *transmissão associada ao cromossoma X*, a designação *Carcinoma Colorectal Familiar de Significado Indeterminado* foi proposta mais recentemente<sup>11</sup>.

Nas famílias com SX, identificaram-se diferenças clínico-patológicas importantes em relação às famílias com CA mas cujos tumores seguem a VM da carcinogénese, nomeadamente: idade mais avançada de diagnóstico das lesões; menor frequência de CCR e de tumores extra-cólicos do espectro da SL (nomeadamente carcinomas do endométrio); menor percentagem de tumores localizados no cólon proximal, pouco diferenciados, com produção de muco e com infiltrado linfocitário péri-tumoral<sup>6,10,12</sup>. O reconhecimento destas características, que se assemelham às das famílias com agregação de CCR que seguem a VS da carcinogénese, poderá vir a ter, no futuro, implicações no programa de vigilância mais adequado a ser instituído.

Neste contexto, propusemo-nos efectuar a pesquisa de IM em CCR pertencentes a um grupo de famílias com CA, bem como correlacionar esses resultados com as características clínico-patológicas correspondentes e com a análise mutacional em genes de reparação do ADN. Nos casos com CCR estáveis e sem mutação identificada, efectuámos ainda o estudo da VS da carcinogénese.

## MATERIALE MÉTODOS

No presente estudo foram incluídos 45 doentes com CCR, pertencentes a 41 famílias com CA para SL, 17 do sexo masculino e 28 do sexo feminino. A média de idades de diagnóstico de CCR foi de  $47,2 \pm 13,2$  anos (26-75).

### Caracterização Clínica e Anátomo-Patológica

Registaram-se as características clínicas, designadamente o número de CCR na família, a frequência de tumores extra-cólicos do espectro da SL, a idade de diagnóstico e a localização dos CCR, assim como as características anátomo-patológicas dos tumores.

Designou-se como cólon proximal o correspondente aos segmentos compreendidos entre o cego e o ângulo esplénico e como cólon distal o correspondente aos seg-

mentos compreendidos entre o ângulo esplénico e o recto. Este último foi definido como o segmento compreendido entre a margem do ânus e os 12 cm.

A produção de muco foi classificada como ausente, inferior ou superior a 50%, sendo neste último caso os tumores designados como mucinosos<sup>13</sup>. O grau de diferenciação foi avaliado segundo os critérios definidos pela OMS<sup>14</sup> e o infiltrado linfocitário péri-tumoral classificado como presente ou ausente.

### Caracterização Molecular

A caracterização molecular foi efectuada através da avaliação das perdas de heterozigotia para a VS e da pesquisa de instabilidade de microssatélites para a VM. Para estas duas metodologias foi utilizado ADN extraído de tecido tumoral e de mucosa não neoplásica colhidos de peças cirúrgicas, após fixação em formol e inclusão em parafina.

A análise das perdas de heterozigotia foi realizada utilizando marcadores de microssatélites próximos e/ou flangeadores dos *loci* dos genes *APC* (D5S346, D5S656, D5S1965, D5S421), *p53* (TP53, D17S796, D17S1796), *SMAD4* (D18S35) e *DCC* (D18S46). Cada par de tecido tumoral/tecido não neoplásico foi amplificado por PCR, tendo-se utilizado *primers* marcados com diferentes fluorocromos. A electroforese foi realizada num sequenciador automático ABI Prism 310 com recurso ao *software GeneScan (Applied Biosystems)*. Para cada amostra de CCR e para cada marcador foi calculada a razão entre a área dos picos dos dois alelos do tecido não neoplásico e tumoral, tendo-se considerado

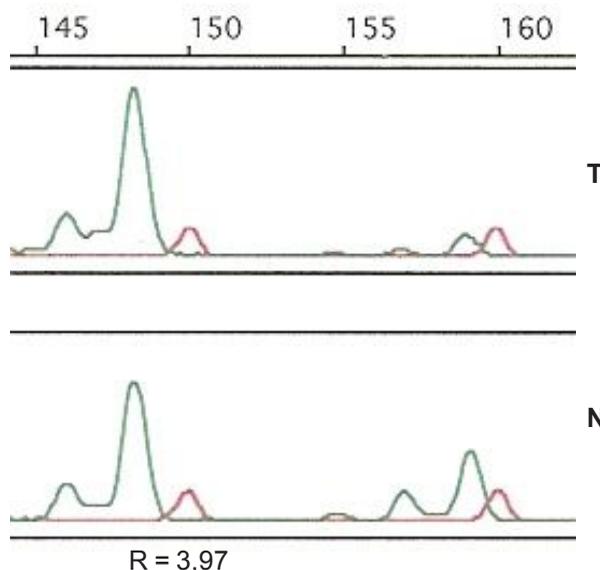


Fig. 1 – Imagem exemplificativa de perda alélica para o marcador D5S421 (razão da área dos picos de 3,97; T – tumor, N – normal) obtida a partir do software GeneScan (ABI PRISM 310, Applied Biosystems)

haver perda de heterozigotia sempre que esta razão fosse superior a 1,5 ou inferior a 0,67 (Figura 1). Considerou-se que um CCR seguia a VS quando existiam alterações em pelo menos dois (50%) dos genes analisados.

A IM foi estudada utilizando o painel de marcadores de Bethesda<sup>15</sup>, D2S123, D5S346, D17S250, BAT-25 e BAT-26, após amplificação por PCR e electroforese em gel de poliacrilamida desnaturante. Para visualização dos produtos de PCR, os géis foram submetidos a revelação após coloração com nitrato de prata. A instabilidade de microssatélites foi definida pela presença de pelo menos um alelo adicional no tumor, quando comparado com a mucosa não neoplásica e, de acordo com os critérios de Bethesda, classificou-se em alto grau (IMA) quando se verificou para dois ou mais marcadores e ausente (EM) quando não foi detectada em nenhum dos cinco marcadores testados. Considerou-se que o CCR seguia a VM na presença de IMA.

Nos doentes com CCR que seguiram a VM, procedeu-se à análise de mutações germinais nos genes de reparação do ADN, *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*, através de DGGE (*Denaturing Gradient Gel Electrophoresis*), seguida de sequenciação directa do produto de PCR. Nos casos em que não foram identificadas mutações pontuais, efectuou-se também MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) para pesquisa de grandes deleções.

### Análise Estatística

Na análise estatística utilizou-se o teste do  $\chi^2$  para comparação de proporções (STATA 8.0). Considerou-se existirem diferenças com significado estatístico na presença de  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

Detectaram-se CCR com IMA em 33/41 (80%) famílias e com EM nas restantes 8/41 (20%).

Em 23/33 (70%) famílias com CCR com IMA foram

identificadas mutações patogénicas num dos genes de reparação do ADN. Nas restantes 10 (30%) famílias, a análise mutacional encontra-se concluída, mas não se detectaram mutações patogénicas, pelo que o diagnóstico genético foi considerado inconclusivo. Comparativamente, na totalidade das famílias com CCR com EM, o diagnóstico genético foi inconclusivo ( $p < 0,0001$ ). De acordo com o descrito anteriormente, classificámos as 8 famílias com EM como Carcinoma Colorectal Familiar de tipo X (SX).

As características clínicas das famílias com SX diferiram daquelas com CCR com IMA – Quadro 1.

Com efeito, nas famílias com SX registou-se uma menor frequência de tumores extra-cólicos do espectro da SL ( $p = 0,06$ ), nomeadamente de carcinoma do endométrio ( $p = 0,06$ ), e globalmente um menor número de casos de CCR, embora a diferença não tenha obtido significado estatístico. Nestas famílias, verificou-se também que os CCR se localizaram principalmente no cólon distal e recto, tendo o contrário ocorrido nas famílias com CCR com IMA – Quadro 2 ( $p = 0,016$ ). Não se registaram diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos de famílias relativamente à média de idades de diagnóstico de CCR.

No que diz respeito às características anátomo-patológicas estudadas, verificámos que a produção de muco foi

Quadro 2 – Localização dos carcinomas do cólon ou recto em famílias com Síndrome X e em famílias com tumores com instabilidade de microssatélites de alto grau

	SX n (%)	CCR com IMA n (%)
Cólon proximal	1/8 (13%)	25/37 (68%)
Cólon distal	3/8 (37%)*	6/37 (16%)
Recto	4/8 (50%)*	6/37 (16%)

SX – Síndrome X; CCR – carcinoma do cólon ou recto; IMA – instabilidade de microssatélites de alto grau; \*  $p = 0,016$  (análise cólon proximal versus cólon distal + recto)

Quadro 1 – Características clínicas das famílias com Síndrome X e das famílias com carcinomas do cólon ou recto com instabilidade de microssatélites de alto grau

	SX	CCR com IMA	p
Nº de casos de CCR na família (média)	3,1 ± 1,1	4,4 ± 2,4	NS
Média de idades de diagnóstico de CCR na família (anos)	51,5 ± 6,2 (44-63)	50,9 ± 9,3 (32-71)	NS
Nº de famílias com tumores extra-cólicos do espectro	4/8 (50%)	27/33 (82%)	0,06
Nº de famílias com tumores do endométrio	1/8 (13%)	9/33 (27%)	0,06

SX - Síndrome X; CCR – carcinoma do cólon ou recto; IMA – instabilidade de microssatélites de alto grau; NS – sem significado estatístico

mais frequente nos tumores das famílias em que se identificaram CCR com IMA (11/37 – 30%), comparativamente com os das famílias que apresentaram CCR com EM (1/8 – 13%). Adicionalmente, os únicos quatro casos de tumores mucinosos foram observados em famílias com CCR com IMA. Registámos também uma menor percentagem de CCR bem ou moderadamente diferenciados (29/33 – 88%) no grupo de famílias com CCR com IMA, comparativamente ao grupo com CCR com EM (7/7 – 100%). Verificou-se ainda que os únicos quatro CCR pouco diferenciados apresentaram IMA. Contudo, as diferenças referentes ao grau de produção de muco e à diferenciação não atingiram significado estatístico. No que diz respeito à presença de infiltrado linfocitário péri-tumoral, é de salientar que nenhum (0/7) tumor com EM apresentou esta característica, contrariamente a 10/31 (32%) CCR com IMA ( $p = 0,08$ ) – Quadro 3.

Quadro 3 – Características patológicas dos carcinomas do cólon ou recto em famílias com Síndrome X e em famílias com tumores com instabilidade de microssatélites de alto grau

Características	SX n (%)	CCR com IMA n (%)
<b>Produção de muco</b>		
Ausente	7 (88%)	26 (70%)
< 50%	1 (12%)	7 (19%)
> 50%	0 (0%)	4 (11%)
		$p = NS$
<b>Grau de diferenciação</b>		
Bem	3 (43%)	11 (33%)
Moderadamente	4 (57%)	18 (55%)
Pouco/Indiferenciado	0 (0%)	4 (12%)
		$p = NS$
<b>Infiltrado linfocitário</b>		
Ausente	7 (100%)	21 (68%)
Presente	0 (0%)	10 (32%)
		$p = 0,08$

SX – Síndrome X; CCR – carcinoma do cólon ou recto; IMA – instabilidade de microssatélites de alto grau; NS – sem significado estatístico

NOTA: Em alguns casos, não estava disponível informação relativa ao grau de diferenciação ou à presença de infiltrado inflamatório péri-tumoral, pelo que o número total referido não é coincidente com a amostra de doentes incluídos no estudo.

A análise da VS nos oito CCR com EM foi positiva em dois casos e negativa em outros dois, o que sugere, nos últimos, uma via alternativa de carcinogénese. Em 4 casos, a análise da VS não foi informativa, por homozigotia para alguns marcadores utilizados, o que impossibilitou concluir quanto à existência de perdas de heterozigotia

para pelo menos dois dos genes estudados. No entanto, salienta-se que 5/8 (63%) casos de CCR com EM apresentaram perdas de heterozigotia no gene *APC*.

## DISCUSSÃO

Os CA são critérios clínicos, tradicionalmente associados à identificação de famílias com SL e que conduzem à pesquisa de mutações germinais nos genes de reparação do ADN. No entanto, apenas se identificam mutações num subgrupo destas famílias, sendo a percentagem de diagnósticos genéticos inconclusivos muito variável entre os estudos, mas estimando-se entre 14 e 55%<sup>16-18</sup>. O desenvolvimento de novas técnicas de análise mutacional, como a MLPA para a pesquisa de grandes deleções, permitiu aumentar a sensibilidade para a detecção de mutações. Contudo, mesmo com o recurso a MLPA, a percentagem de diagnósticos genéticos positivos não ultrapassa, na nossa experiência, os 76%<sup>19</sup>. Para além da limitação referente à sensibilidade, também é hoje reconhecido que os CA não apresentam uma especificidade tão elevada como outrora lhes foi atribuída, ou seja, podem incluir famílias sem SL em base genética<sup>16</sup>.

Com efeito, em algumas famílias sem mutação identificada, os CCR não apresentam IM, o que significa que não seguiram a VM da carcinogénese. Este grupo de famílias, que preenche os CA e apresenta CCR com EM e diagnóstico genético inconclusivo, foi recentemente assumido como uma entidade diferente, sendo a sua base genética actualmente desconhecida. Lindor et al denominaram-na por Carcinoma Colorectal Familiar de tipo X, face à sua etiopatogénese indeterminada<sup>10</sup>. Este estudo, que incluiu 3422 indivíduos pertencentes a 161 famílias com CA, documentou uma menor incidência de tumores nas famílias com SX, bem como o seu desenvolvimento em idades mais tardias, que se aproximam das dos esporádicos.

Estudos posteriores reforçaram a noção de que este grupo de famílias não apresenta, na sua maioria, as mesmas características clínico-patológicas que habitualmente se verificam nos tumores que seguem a VM<sup>6,11,20</sup>. À semelhança dos resultados por nós obtidos, também naqueles estudos as famílias com CCR com EM apresentaram tumores com localização predominante no cólon distal ou recto e menor percentagem de casos com produção de muco ou com infiltrado linfocitário péri-tumoral. No entanto, em relação à média de idades de diagnóstico de CCR na SX, não registámos diferenças entre os grupos estudados. Pensamos ser importante salientar que em relação a várias características analisadas, a dimensão da amostra pode ter condicionado a não obtenção de resultados com signifi-

ficado estatístico inequívoco, apesar de se terem registado diferenças percentuais importantes.

Nas famílias com SX, não só se verificou uma menor média de número de casos de CCR, como sobretudo de tumores extra-cólicos do espectro. Não efectuámos a análise dos tumores extra-cólicos que não pertencem ao espectro da SL, mas Valle et al fizeram-no e concluíram que também eles são menos frequentes nestas famílias<sup>20</sup>. Estes resultados sugerem que o(s) gene(s) mutado(s) nas famílias que preenchem os CA cujos tumores não seguem a VM, poderão encontrar-se principalmente implicados na carcinogénese do cólon e recto, o que os diferencia dos genes de reparação do ADN, cuja mutação implica maior perda de controlo genómico. Este aspecto reveste-se de grande relevância clínica, uma vez que a vigilância preconizada para as famílias com CA poderá, num futuro próximo, ser questionada no grupo que não segue a VM. Com efeito, a realização de colonoscopia anual/bienal a partir dos 20-25 anos, não parece adequada para elementos em risco pertencentes a famílias cujos CCR surgem num número menor e numa idade mais próxima da dos esporádicos; também a ecografia ginecológica com sonda endovaginal a partir dos 30-35 anos e com periodicidade anual/bienal poderá não ser apropriada em famílias cuja incidência de carcinomas do endométrio se aproxima da registada na população em geral. Lindor et al, face aos resultados obtidos no seu estudo, consideraram não existir indicação para incluir os indivíduos em risco pertencentes a famílias com CA cujos tumores não seguem a VM nos protocolos intensivos de vigilância internacionalmente aceites para a SL. Nestes casos, sugeriram que a primeira colonoscopia devesse ser realizada 5 a 10 anos antes da idade mais precoce de diagnóstico de CCR na família, com uma periodicidade determinada pelos achados deste exame. Do nosso ponto de vista, as recomendações referidas merecem reflexão, mas não deverão ser assumidas sem que antes sejam mais adequadamente esclarecidos os aspectos particulares desta nova entidade. Em consonância com esta opinião, Lynch et al defenderam a manutenção dos protocolos de vigilância recomendados para a SL<sup>11</sup>.

Existem ainda alguns aspectos que devem ser considerados, podendo revestir-se de importância primordial para uma melhor caracterização da SX e da vigilância mais adequada a aplicar. Em primeiro lugar, a pesquisa de IM é habitualmente efectuada num único CCR da família, tal como aconteceu no nosso estudo. Esse tumor poderá constituir uma fenocópia, ou seja, pertencer a um indivíduo portador de uma mutação mas ter tido origem num evento esporádico; ou poderá esse indivíduo não ser portador da mutação da família, mas ser o único em que o CCR tenha

sido analisado. Em segundo lugar, sabe-se que as mutações patogénicas nalguns genes de reparação do ADN, como é o caso do *MSH6*, podem associar-se ao desenvolvimento de tumores sem IM ou com IM de baixo grau<sup>21</sup>. Neste contexto, a realização de imunohistoquímica poderá ser muito útil como método complementar para a definição da sua base genética. Assim sendo, o presente trabalho apresenta como limitação não ter sido efectuado o estudo da expressão das proteínas codificadas pelos genes de reparação do ADN. Contudo, sabe-se que a probabilidade de um CCR ser estável no contexto da SL é baixa. Outra limitação consiste no facto de não termos realizado a análise mutacional para o gene *PMS2*. Apesar das mutações neste gene serem consideradas raras, há dados que sugerem que possam encontrar-se subvalorizadas<sup>22</sup>.

Na actualidade, devemos encarar com alguma reserva a modificação do programa de vigilância em doentes pertencentes a famílias com CA cujos CCR não apresentam IMA, face ao quase total desconhecimento dos mecanismos de carcinogénese implicados nesta nova entidade. Apesar da probabilidade ser extremamente baixa, perante o preenchimento dos CA, em teoria não podemos excluir que algumas destas famílias possam representar uma agregação de tumores esporádicos, o que explicaria, em parte, as características clínico-patológicas a elas associadas. No entanto, a maior parte deverá resultar de mutações em gene(s) até à data não identificado(s).

Com a finalidade de tentar identificar algumas das alterações moleculares que caracterizam a SX, e tendo em conta a existência de duas vias bem definidas de carcinogénese do cólon e recto, estudámos a VS nesse grupo de famílias. Em 2/8 casos, a análise da VS foi positiva, o que pode sugerir o envolvimento de um ou mais genes implicados no processo de carcinogénese associado à VS na predisposição genética para esta síndrome. Nestes casos, não nos parece indicado, até à melhor caracterização da SX, adoptar um esquema de vigilância diferente do preconizado para a SL, devido às limitações apontadas anteriormente. Em 4/8 casos, os resultados da VS não foram informativos. No entanto, em 2/8 casos, os tumores não seguiram a VS, o que sugere uma via alternativa de carcinogénese, ainda não caracterizada. Mueller-Koch e colaboradores analisaram a VS em CCR de três doentes pertencentes a famílias com SX e em todos foi detectada instabilidade cromossómica<sup>23</sup>, o que suporta o envolvimento da VS, analisada neste estudo, pelo menos numa parte dos casos de SX. Deste modo, estes resultados levam-nos a sugerir que a pesquisa dos genes causadores desta nova entidade deverá ser iniciada pelos que fazem parte da VS.

É de salientar que 5/8 casos (63%) apresentaram perdas de heterozigotia no gene *APC*. Este resultado deve ser tido em consideração, visto que, mesmo nos tumores que seguem a VS (tumores esporádicos estáveis), de acordo com o que tem sido documentado na literatura e também em estudos efectuados pelo nosso grupo, esta percentagem não é superior a 50%<sup>24,25</sup>.

Apesar de ser conhecida a importância da perda de função do gene *APC* na carcinogénese do cólon ou recto, este gene é menos frequentemente implicado no processo de carcinogénese associado à SL do que nos tumores esporádicos estáveis (aproximadamente 40% versus 85% dos casos)<sup>25-27</sup>. Este facto vem salientar ainda mais as diferenças, também a nível molecular, entre a SL associada à VM e a SX, a qual parece estar mais associada à VS. Adicionalmente, a maior frequência de perdas de heterozigotia para o gene *APC* nestes casos de SX, quando comparada com a observada nos tumores esporádicos estáveis que seguem a VS, leva-nos a sugerir que aquele gene possa ter um papel importante na carcinogénese associada à SX. Por outro lado, o facto de a frequência de perdas de heterozigotia para o *APC* nestes casos de SX ser mais próxima da registada em adenomas ou CCR no contexto de polipose adenomatosa familiar, quando a mutação germinal truncante se localiza numa região específica do *APC*<sup>28,29</sup>, pode sugerir que algumas alterações germinais no gene *APC*, com um baixo carácter patogénico, contribuam para a predisposição genética numa parte das famílias com SX. Será importante confirmar esta percentagem de perdas de heterozigotia no *APC* através da análise de um maior número de casos, o que não foi ainda efectuado em estudos anteriores.

## CONCLUSÃO

Em conclusão, as famílias com CA com CCR estáveis apresentaram características particulares, reforçando a existência de uma entidade diferente da SL. Assim sendo, parece cada vez mais claro que nem todas as famílias que preenchem os CA têm SL. Esta última designação deverá ser reservada às famílias cujos tumores seguem a VM da carcinogénese e nas quais se identifica uma mutação num dos genes de reparação do ADN.

No entanto, com base nos conhecimentos actualmente disponíveis, não é possível definir recomendações de vigilância particulares para os indivíduos pertencentes a famílias com SX, devendo aplicar-se os protocolos internacionalmente aceites para as famílias que preenchem os CA.

## Conflito de interesses:

Os autores declaram não ter nenhum conflito de interesses relativamente ao presente artigo.

## Fontes de financiamento:

Não existiram fontes externas de financiamento para a realização deste artigo.

## BIBLIOGRAFIA

1. LYNCH HT, DE LA CHAPELLE A: Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-818
2. WATSON P, LYNCH HT: Extracolonic cancer in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer* 1993;71:677-685
3. VASEN HF, MECKLIN JP, KHAN PM, LYNCH HT: The International Collaborative Group on Hereditary 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. *Gastroenterol* 1999;116:1453-6
5. LYNCH HT, DE LA CHAPELLE A: Hereditary colorectal cancer. *N Engl J Med* 2003;348:919-932
6. LLOR X, PONS E, XICOLA R et al: Differential features of colorectal cancers fulfilling Amsterdam Criteria without involvement of the mutator pathway. *Clin Cancer Res* 2005;11:7304-10
7. CAHILL DP, LENGAUER C, YU J et al: Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers. *Nature* 1998;392:300-3
8. LAMBERTI C, KRUSE R, RUEFELS C et al: Microsatellite instability: a useful diagnostic tool to select patients at high risk for hereditary non-polyposis colorectal cancer – a study in different groups of patients with colorectal cancer. *Gut* 1999;44:839-843
9. SAMOWITZ WS, CURTIN K, LIN HH et al: The colon cancer burden of genetically defined hereditary nonpolyposis colon cancer. *Gastroenterol* 2001;121:830-8
10. LINDOR N, RABE K, PETERSEN G et al: Lower cancer incidence in Amsterdam-I criteria families without mismatch repair deficiency (Familial Colorectal Cancer Type X). *JAMA* 2005;293:1979-85
11. LYNCH HT, BOLAND CR, GONG G et al: Phenotypic and genotypic heterogeneity in the Lynch syndrome: diagnostic, surveillance and management implications. *Eur J Hum Genet* 2006;14:390-402
12. JASS JR, COTTIER DS, JEEVARATNAM P et al: Diagnostic use of microsatellite instability in hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Lancet* 1995;346:1200-1
13. WIGGERS T, ARENDS JW, SCHUTTE B, VOLOVICS L, BOSMAN FT: A multivariate analysis of pathologic prognostic indicators in large bowel cancer. *Cancer* 1986;61:386-395
14. MORSON BC, SOTIN LH: Types histologiques des tumeurs intestinales. Classification histologique internationale des tumeurs. N° 15, 1976
15. BOLAND CR, THIBODEAU SN, HAMILTON SR 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
16. JASS J: Hereditary non-polyposis colorectal cancer: the

- rise and fall of a confusing term. *World J Gastroenterol* 2006; 12:4943-50
17. AALTONEN LA, PELTOMAKI P, LEACH FS et al: Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-6
18. LYNCH HT, LYNCH J: Lynch syndrome. genetics, natural history, genetic counselling and prevention. *J Clin Oncol* 2000;18:19S-31S
19. FERREIRA S, CLARO I, FRANCISCO I et al: A pesquisa de grandes deleções nos genes *MLH1* e *MSH2* aumenta a eficácia do diagnóstico genético na Síndrome de Lynch. *GE – Jornal Português de Gastroenterologia* 2005;12(Suppl):19 (publicado sob a forma de *abstract*)
20. VALLE L, PEREA J, CARBONELL P et al: Clinicopathologic and pedigree differences in Amsterdam I-positive hereditary nonpolyposis colorectal cancer families according to tumor microsatellite instability status. *J Clin Oncol* 2007;25:781-6
21. BUTTIN BM, POWELL MA, MUTCH DG et al: Penetrance and expressivity of *MSH6* germline mutations in seven kindreds not ascertained by family history. *Am J Hum Genet* 2004; 74:1262-9
22. HAMPEL, FRANKEL WL, MARTIN E et al: Screening for the Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *N Engl J Med* 2005;352:1851-60
23. MUELLER-KOCH Y, VOGELSANG H, KOPP R et al: Hereditary non-polyposis colorectal cancer: clinical and molecular evidence for a new entity of hereditary colorectal cancer. *Gut* 2005;54:1733-40
24. JASS JR, BIDEN KG, CUMMINGS MC et al: Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *J Clin Pathol* 1999;52:455-460
25. ROWAN AJ, LAMLUM H, ILYAS M et al: *APC* mutations in sporadic colorectal tumors: a mutational «hotspot» and interdependence of the «two hits». *PNAS* 2000;97:3352-7
26. MIYAKI M, IJIMA T, KIMURA J et al: Frequent mutation of *beta-catenin* and *APC* genes in primary colorectal tumors from patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cancer Res* 1999;59:4506-9
27. HUANG J, ZHENG S, JIN S-H, ZHANG S-Z: Somatic mutations of *APC* gene in carcinomas from hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *World J Gastroenterol* 2004;10:834-6
28. LAMLUM H, ILYAS M, ROWAN A et al: The type of somatic mutation at *APC* in familial adenomatous polyposis is determined by the site of the germline mutation: a new facet to Knudson's «two-hit» hypothesis. *Nat Med* 1999;5:1071-5
29. ALBUQUERQUE C, BREUKEL C, VAN DER LUIJT R et al: The «just-right» signaling model: *APC* somatic mutations are selected based on a specific level of activation of the *beta-catenin* signaling cascade. *Hum Mol Genet* 2002;11:1549-60