

Análise de variantes germinativas nos genes de reparo (MMR) em pacientes com câncer colorretal da FCEcon

Lívia Raquel Macedo Gusmão; Estudante de Biomedicina; Universidade Nilton Lins; liviagusmao27@gmail.com;
Fernando Carvalho Raid; Estudante de Biomedicina; Centro Universitário Fametro;
Mikele Praia de Oliveira; Mestranda -PPGIBA;
Flávia Níniver de Oliveira Gomes; Mestranda -PPGIBA;
Dra. Kátia Luz Torres Silva; Diretora Ensino e Pesquisa – FCECON;
Dra. Valquíria do Carmo Alves Martins; Pesquisadora – FCECON;
Dra. Giovana Tardin Torrezan; CIPE-A.C. Camargo Cancer Center;
Me. Nayara Sousa Castro; CIPE-A.C. Camargo Cancer Center;

1. Introdução

O Câncer colorretal (CCR) é uma das neoplasias mais prevalentes do trato gastrointestinal e ocupa a terceira posição nos níveis de incidência global, representando cerca de 9,6% dos casos de câncer em todo o mundo¹. Segundo as estimativas da Agência Internacional de Pesquisa em Câncer (IARC), entre 2020 e 2040, espera-se um aumento significativo de mais de 3 milhões de casos de pacientes com CCR².

No Brasil, a estimativa para o triênio de 2023/2025 aponta cerca de 45.630 novos casos por ano, sendo 21.970 em homens e 23.660 em mulheres³, evidenciando a importância de se compreender os fatores de risco envolvidos no desenvolvimento da doença. Entre os fatores modificáveis, destacam-se tabagismo, etilismo, consumo de carne vermelha ou processadas, e baixa ingestão de vegetais, fibras e frutas³. Já os fatores não modificáveis incluem predisposições genéticas e síndromes hereditárias, como a síndrome de Lynch⁴.

O CCR é uma neoplasia heterogênea resultante de múltiplos eventos genéticos e epigenéticos. Entre as principais vias moleculares envolvidas estão a via adenoma-carcinoma, associada à instabilidade cromossômica (presente em 70% a 90% dos casos), e a via serrilhada (10% a 20%)⁴. A instabilidade de microssatélites (MSI), um marcador molecular relevante, é observada em aproximadamente 12 % a 17% dos casos, sendo cerca de 3% associados à síndrome de Lynch⁵.

Os microssatélites são sequências curtas e repetitivas de DNA que não codificam proteína, com uma variação de comprimento entre um e dez pares de base de nucleotídeos. Durante a replicação, essas regiões estão sujeitas a erros que, se não corrigidos, resultam em MSI. O sistema de reparo de incompatibilidade de DNA (MMR) é formado pelas proteínas MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6, que atuam em pares funcionais (MLH1/PMS2 e MSH2/MSH6) na detecção e correção desses erros⁶.

O câncer colorretal hereditário sem polipose ou HNPCC, também conhecido como síndrome de Lynch é uma condição autossômica dominante causada por variantes germinativas nos genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, e *PMS2*, ou exclusões em *EPCAM*, e está associada a um risco aumentado para vários tipos de câncer, frequentemente com início precoce^{5,7}. Deste modo, essa síndrome está intimamente relacionada à deficiência do sistema MMR e à ocorrência de MSI.

Diante desse contexto, o objetivo deste estudo é caracterizar as variantes germinativas nos genes de reparo (MMR) *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* e *PMS2* em pacientes com câncer colorretal da Fundação Centro e Controle de oncologia do Estado do Amazonas (FCECON).

2. Material e Métodos

Trata-se de um estudo analítico, descritivo, prospectivo e retrospectivo voltado à análise de variantes germinativas em genes de reparo (MMR) por meio do sequenciamento de nova geração (NGS) em pacientes diagnosticados com câncer colorretal atendidos na Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). Esta pesquisa está vinculada ao projeto de doutorado "*Caracterização Clínica e Molecular de Pacientes com Câncer Colorretal atendidos na FCECON*", que faz parte do projeto guarda-chuva intitulado "*Análise do Espectro Molecular e Clínico do Câncer Colorretal: da Epidemiologia e Qualidade de Vida à Genética e Análises Ômicas*" (Projeto EMCOR). Aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCECON (CAAE: 52343821.2.0000.0004) em 20 de dezembro de 2021.

As amostras de leucócitos foram obtidas de forma retrospectiva e prospectiva dos pacientes participantes do Projeto EMCOR. Nas coletas prospectivas, foram realizadas a abordagem ao paciente e aplicação do TCLE (Termo de Consentimento Livre e Esclarecido), e posteriormente feito a coleta sanguínea. O sangue periférico foi coletado em tubos com EDTA e processado conforme protocolos padronizados para separação de plasma e leucócitos. As amostras foram armazenadas em microtubos de 1,5 mL livres de nucleases em freezer a -80°C no Laboratório de Biologia Molecular da FCECON.

A extração do DNA foi realizada com o kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega, EUA). A qualidade e a concentração do DNA foram avaliadas com o espectrofotômetro NanoDrop Lite e o fluorímetro Qubit 4.0 (Thermo Fisher Scientific, EUA).

A detecção de variantes germinativas foi conduzida por sequenciamento de nova geração (NGS), utilizando um painel multigênico personalizado composto por 62 genes com evidências classificadas como: definitiva/forte, moderada, limitada ou não avaliada para predisposição ao câncer colorretal. Esse painel foi desenvolvido com base nos trabalhos de Silva (2022), Seifert (2019) e Valle et al. (2019)⁸⁻¹⁰.

A preparação da biblioteca genômica foi realizada com o kit XGEN™ DNA LIBRARY PREP EZ (Integrated DNA Technologies – IDT), seguida pelo sequenciamento na plataforma NextSeq 2000 (Illumina), com cobertura mínima de 30X. O sequenciamento foi realizado no Laboratório do Grupo de Genômica Clínica e Funcional do Centro Internacional de Pesquisa - A.C. Camargo Cancer Center.

As análises de bioinformática incluíram o alinhamento e detecção de variantes com o Isaac Enrichment v2.1 (BaseSpace, Illumina), seguido de anotação e filtragem no software VarSeq (Golden Helix). As variantes foram posteriormente avaliadas em bancos de dados clínicos como ClinVar, bem como em plataformas automatizadas de classificação, como Varsome e Franklin (Genoox). As variantes foram classificadas de acordo com os critérios do American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG), considerando parâmetros como frequência populacional, evidências funcionais, segregação familiar e dados de literatura científica.

3. Resultados e discussão

Foi realizado o sequenciamento de 56 amostras, com uma cobertura média por base de 1.865,86x e cobertura de 100% das bases-alvo com profundidade mínima de 50 leituras, garantindo alta confiabilidade analítica.

Foram identificadas variantes patogênicas no gene *MLH1*, como a mutação p.Arg487* (c.1459C>T), presente em duas amostras. Essa alteração de sentido trocado (nonsense) resulta em um códon de parada prematuro (stop gain), levando à perda de expressão das proteínas MLH1 e PMS2, conforme confirmado por imunohistoquímica (IHQ).

Outra variante patogênica no gene *MLH1*, a p.Arg226* (c.676C>T), também do tipo stop gain, foi detectada. Assim como no caso anterior, observou-se ausência de expressão de MLH1 e PMS2 por IHQ.

Além das variantes patogênicas, foi identificada uma variante de significado clínico incerto (VUS) no gene *MSH6*, do tipo missense (c.334A>G, p.Asn112Asp (Quadro 1).

Quadro 1. Descrição de dados clínicos e variantes patogênicas e VUS dos genes de MMR. Fonte: Sousa-Castro, 2024.

ID	Idade CCR	Status MMR	História familiar (CCR)	Gene	AA Alterado	Códon alterado	Tipo de variante	ACMG
38	57	NR	1 Parente de 1º grau	MLH1	p.Arg487*	c.1459C>T	Stop Gain	P
51	30	MSH2 Negativo	1 parente de 1º grau e 2 de 2º	<i>EPCAM-MSH2</i>	-	Del; EPCAM exon 4-9 e MSH2 exon 1-7 del	CNV deleção	P
145	24	Perda MLH1/PMS2	1 Parente de 1º grau	MLH1	p.Arg226*	c.676C>T	Stop Gain	P
171	57	Perda MLH1/PMS2	1 Parente de 1º grau	MLH1	p.Arg487*	c.1459C>T	Stop Gain	P
172	57	Sem informação	1 Parente de 1º grau	MSH6	p.Asn112Asp	c.334A>G	Missense	VUS

Legenda: NR- *No results*: Sem resultados : AA- Aminoácido; c.1459C>T- substituição da citosina por uma timina na posição 1459; c.676C>T- substituição de citosina por timina na posição 676; p.Arg487*- proteína nonsense, que sofreu uma troca de base por um códon de parada no aminoácido Arginina, na posição 487; p.Arg226*- proteína nonsense que possui um códon de parada no aminoácido Arginina, na posição 226; P- Patogênica; VUS- Variante de significado incerto.

Adicionalmente, foram detectadas variantes estruturais (VS) em dois pacientes da coorte. Uma delas corresponde a uma deleção complexa (DEL) envolvendo os genes *EPCAM* e *MSH2* (chr2:47.375.224-47.429.952_Del; *EPCAM* éxons 4–9 e *MSH2* éxons 1–7), que resultou na perda do final do gene *EPCAM* e do início do gene *MSH2*, impactando níveis a expressão de *MSH2*. Essa alteração impacta a estabilidade do transcrito de *MSH2*, levando ao seu silenciamento epigenético e inativação funcional, mecanismo já descrito como associado à síndrome de Lynch, uma condição hereditária que aumenta o risco de câncer colorretal e outros tipos de câncer^{11–14}.

A segunda variante estrutural identificada foi uma duplicação envolvendo os genes *PMS2* e *AIMP2*; entretanto, a classificação funcional dessa alteração ainda requer análises complementares e dados adicionais de IHQ.

Um dos achados mais relevantes deste estudo foi a confirmação de um caso de Síndrome de Lynch em um paciente com menos de 30 anos de idade, com histórico familiar significativo de câncer colorretal em pelo menos duas gerações. Achado que ressalta a importância da triagem genética precoce em contextos familiares sugestivos.

Esses resultados corroboram evidências da literatura que apontam as mutações germinativas nos genes MMR, sobretudo no *MLH1*, como eventos centrais na predisposição ao câncer colorretal. Essas mutações levam à falha no reparo de erros de pareamento de DNA, provocando instabilidade genômica e aumentando o risco de neoplasias malignas¹⁵.

A presença de deleções envolvendo *EPCAM*, como observado neste estudo, está igualmente bem documentada como causa indireta de inativação de *MSH2*, reforçando sua inclusão em painéis diagnósticos voltados à investigação da síndrome de Lynch^{5,15}.

Portanto, a caracterização detalhada das variantes germinativas em genes do sistema MMR é essencial para compreender os mecanismos moleculares da tumorigênese colorretal, além de embasar condutas clínicas personalizadas, desde o diagnóstico precoce até estratégias preventivas e terapêuticas direcionadas para pacientes e seus familiares de risco.

4. Conclusões

A análise de variantes germinativas em genes de reparo do DNA (MMR) permitiu a identificação de alterações clinicamente relevantes associadas à predisposição ao câncer colorretal, incluindo mutações patogênicas nos genes *MLH1* e *MSH2*, além de uma deleção estrutural envolvendo *EPCAM-MSH2*, compatível com síndrome de Lynch. Esses achados reforçam a importância da triagem genética em pacientes com histórico familiar de câncer, especialmente em diagnósticos em idade precoce. A aplicação de painéis multigênicos por NGS, aliados à análise imunohistoquímica e bioinformática especializada, demonstrou elevada eficácia na detecção de variantes com impacto clínico. A detecção precoce dessas alterações pode direcionar estratégias terapêuticas, vigilância individualizada e aconselhamento genético familiar, ampliando as perspectivas de prevenção e manejo personalizado do CCR.

Palavras-chave: Câncer colorretal; Reparo de Erro de Pareamento de DNA; Proteína *MLH1*; Síndrome de Lynch; Proteína *PMS2*.

Agradecimentos

A Deus, que é digno de todas as coisas, e que sem Ele nada disso seria possível. Aos meus pais, amigos, grupo de pesquisa por todo apoio e acolhimento para que este trabalho se concretizasse.

Divulgação

O (s) autor (es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, o Congresso Pan-Amazônico de Oncologia detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação deste resumo, por meio eletrônico.

5. Referências

1. Bray F, Laversanne M, Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Soerjomataram I, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2024;74:229–63.
2. Morgan E, Arnold M, Gini A, Lorenzoni V, Cabasag CJ, Laversanne M, et al. Global burden of colorectal cancer in 2020 and 2040: incidence and mortality estimates from GLOBOCAN. *Gut*. 2023;72:338–44.
3. INCA IN de C. Estimativa 2023: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro, RJ: Instituto Nacional De Câncer; 2023. 160 p.
4. Dekker E, Tanis PJ, Vleugels JLA, Kasi PM, Wallace MB. Colorectal cancer. *The Lancet*. 2019;394:1467–80.
5. Boland CR, Goel A. Microsatellite Instability in Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2010;138:2073-2087.e3.
6. Ros J, Baraibar I, Saoudi N, Rodriguez M, Salvà F, Tabernero J, et al. Immunotherapy for Colorectal Cancer with High Microsatellite Instability: The Ongoing Search for Biomarkers. *Cancers*. 2023;15:4245.

7. Martínez-Roca A, Giner-Calabuig M, Murcia O, Castillejo A, Soto JL, García-Heredia A, et al. Lynch-like Syndrome: Potential Mechanisms and Management. *Cancers*. 2022;14:1115.
8. Silva SIO da. Caracterização clínica, molecular e genética de pacientes com câncer colorretal abaixo de 50 anos [Internet]. 2022 [citado 21 de agosto de 2025]. Disponível em: <https://accamargo.phlnet.com.br/Doutorado/2022/SIOSilva/SIOSilva.pdf>
9. Seifert BA, McGlaughon JL, Jackson SA, Ritter DI, Roberts ME, Schmidt RJ, et al. Determining the clinical validity of hereditary colorectal cancer and polyposis susceptibility genes using the Clinical Genome Resource Clinical Validity Framework. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2019;21:1507–16.
10. Valle L, Vilar E, Tavtigian SV, Stoffel EM. Genetic predisposition to colorectal cancer: syndromes, genes, classification of genetic variants and implications for precision medicine. *J Pathol*. 2019;247:574–88.
11. Nugroho PP, Ghazali SAS, Buchanan DD, Pisano MI, Reece JC. Risk of cancer in individuals with Lynch-like syndrome and their families: a systematic review. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2023;149:25–46.
12. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012;487:330–7.
13. Tuttlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. Germline deletions in the EPCAM gene as a cause of Lynch syndrome - literature review. *Hered Cancer Clin Pract*. 2013;11:9.
14. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med Off J Am Coll Med Genet*. 2015;17:405–24.
15. Dámaso E, González-Acosta M, Vargas-Parra G, Navarro M, Balmaña J, Ramon Y Cajal T, et al. Comprehensive Constitutional Genetic and Epigenetic Characterization of Lynch-Like Individuals. *Cancers*. 2020;12:1799.

Financiamento: FAPEAM – Programa PAIC