

PREVALÊNCIA DA PERDA DE FUNÇÃO DOS GENES MSH2, MSH6 E MLH1 NA SÍNDROME DE LYNCH

PREVALENCE OF FUNCTION LOSS OF GENES MSH2, MLH1, AND MSH6 IN THE LYNCH SYNDROME

¹SANTIS, J.O.; ²REIS, L.E.; ³BERALDO-MASSOLI, M. C.; ⁴BITTENCOURT, R.A.C.

¹ Estudante do curso de Biomedicina e diretora de Ensino da Liga Acadêmica de Hematologia e Hemoterapia da Biomedicina (LAHB), UNIP, Assis; ² Estudante do curso de Farmácia pela UNIP, Assis; ³ Biomédica, Doutora em Microbiologia Agropecuária, professora na UNIP, Assis; ⁴ Biomédica, Coordenadora Auxiliar do curso de Biomedicina e Professora Orientadora da LAHB, UNIP, Assis

RESUMO

A Síndrome de Lynch é uma doença hereditária que acarreta mutações em alguns dos genes de reparação do DNA, como o MSH2, MSH6 e MLH1. A inativação ou mau funcionamento desses genes pode resultar na concentração de pareamentos incorretos na sequência genética. Para detecção de mutações nesses genes, realizam-se métodos de sequenciamento genético, determinação de instabilidade de microsátelite e imunohistoquímica. O objetivo desse trabalho é reunir na literatura material sobre os fatores genéticos da Síndrome de Lynch, determinando a atuação dos genes MSH2, MSH6 e MHL1 nessa condição. O presente trabalho foi elaborado a partir de uma revisão de literatura. Foram selecionados dez artigos para a comparação entre eles acordo com os genes que apresentaram perda de função nos indivíduos, e método de análise para detecção da mutação. De acordo com os resultados obtidos, os genes MLH1 e MSH2 são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome, enquanto o gene MSH6 demonstrou perda de função em menor prevalência. Para determinação dessa mutação os métodos utilizados foram imunohistoquímica e sequenciamento.

Palavras-chave: Síndrome de Lynch. Gene de Reparo. Câncer Colorretal.

ABSTRACT

Lynch syndrome is a hereditary disease that causes mutations in some of the DNA repair genes, such as MSH2, MSH6 and MLH1. Inactivation or malfunction of these genes can result in the concentration of mismatches in the genetic sequence. For detection of mutations in these genes, genetic sequencing, microsatellite instability and immunohistochemistry determination are performed. The objective of this work is to gather in literature about the genetic factors of Lynch Syndrome, determining the performance of the genes MSH2, MSH6 and MHL1 in this condition. This paper is based on a literature review. Ten articles were selected for comparison between them according to the genes that showed loss of function in the individuals, and analysis method to detect the mutation. According to the results, the MLH1 and MSH2 genes are the lead responsible for the syndrome development, while the MSH6 gene appeared with lost of function in fewer cases. To determinate this mutations, the methods used were immunohistochemistry and genetic sequencing.

Keywords: Lynch Syndrome. Repair Gene. Colorectal Cancer.

INTRODUÇÃO

O câncer colorretal (CCR) está entre as patologias mais comuns na área, atingindo homens e mulheres de forma igual. O diagnóstico em estágios iniciais é considerado um fator para o bom prognóstico, promovendo a sobrevida de cinco anos em mais da metade dos indivíduos nos países desenvolvidos. O aparecimento do câncer colorretal ocorre de forma esporádica em 80% dos indivíduos acometidos por essa neoplasia. A porcentagem restante está relacionada com a suscetibilidade

hereditária, como no caso da síndrome de Lynch (SL) (SCHNEIDER, 2015; PINHEIRO, 2014; GERMINI *et al*, 2016).

A Síndrome de Lynch possui caráter autossômico dominante e caracteriza a alta predisposição para o CCR em indivíduos jovens. Essa síndrome se origina por uma deficiência em genes do sistema de reparo de pareamento errôneo do DNA (*Mismatch Repair Sistem* – MMR) (SCHNEIDER, 2015).

O sistema MMR tem grande importância na manutenção e estabilidade do código genético. Defeitos nessa via de reparação têm relação com mais de uma variedade de câncer. Dentre os nove genes já identificados como pertencentes a esse sistema, podemos encontrar os MSH6, MSH2 (MutS homólogo 6 e 2) e MLH1 (MutL homólogo 1), que possuem correlação com o CCR. Mutações nos genes MSH2 e MLH1 representam mais de 80% dos casos de mutação na SL. Variações no genoma do MSH6 apresentam um fenótipo diferente, com uma penetrância menor em relação às mutações do gene MSH2 (SILVA, 2011; FERREIRA, 2014).

O diagnóstico da SL é feito primeiramente clínico, porém conta-se com exames complementares para a determinação das mutações ou da expressão gênica. Exames como o teste da instabilidade de microssatélites, a imunohistoquímica e o sequenciamento genético (FERREIRA, 2014).

O objetivo desse trabalho é reunir na literatura material sobre os fatores genéticos da Síndrome de Lynch, determinando a atuação dos genes MSH2, MSH6 e MHL1 nessa condição.

METODOLOGIA

Esse trabalho foi elaborado a partir de uma revisão de literatura em bases de dados como Scielo, PubMed e Google Acadêmico, utilizando artigos, teses e dissertações, publicados entre 2005 e 2016. Os termos utilizados na pesquisa dos artigos foram “síndrome de Lynch” e seu correspondente em inglês “Lynch’s syndrom”, assim como “HSM2” e “HSM6”. Dentre os artigos encontrados, foram selecionados dez que se encaixavam no perfil de determinação da ação dos genes do sistema de reparação do DNA na síndrome de Lynch, para comparação dos resultados encontrados por esses autores. Foram excluídos artigos de revisão ou estudos que não avaliavam especificamente os genes de reparo relacionado à síndrome de Lynch e CCR. A comparação foi feita de acordo com os genes que apresentaram perda de

função nos indivíduos diagnosticados com câncer colorretal e/ou com a síndrome de Lynch.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Síndrome de Lynch é uma doença hereditária com transmissão autossômica dominante de alta penetrância que acarreta mutações em alguns dos genes de reparação do DNA, como o MSH, MSH6 e MLH1. O sistema de reparação do DNA atua como responsável pela correta reposição dos nucleotídeos que apresentem um pareamento errôneo durante o processo de replicação da célula. A inativação ou mau funcionamento desses genes pode resultar na concentração de pareamentos incorretos na sequência genética (PARREIRAS *et al*, 2013).

Conforme descrito na tabela 1, dos dez artigos selecionados, sete indicaram perda de função dos genes MLH1 e para MSH2 (LAWES *et al*, 2005; FERREIRA *et al*, 2006; ROSA *et al*, 2008; RAMSHOEK *et al*, 2009; BASHYAM *et al*, 2015; ZIADA-BOUCHAAR *et al*, 2016; ZUMSTEIN *et al*, 2016; MORENO-ORTIZ *et al*, 2016), enquanto para o gene MSH6, seis autores (FERREIRA *et al*, 2006; PROSCURSHIM *et al*, 2007; RAMSHOEK *et al*, 2009; BASHYAM *et al*, 2015; ZIADA-BOUCHAAR *et al*, 2016; ZUMSTEIN *et al*, 2016) encontraram perda da função. MORENO-ORTIZ *et al* (2016) e FERREIRA *et al* (2006) encontraram a maior porcentagem para perda de função do MLH1, 66,7 e 55%, respectivamente. Para o gene MSH2, foi encontrado 42,5% de perda de função também pelo autor FERREIRA *et al* (2006). A maior prevalência em relação ao MSH6 foi encontrada por RAMSHOEK *et al* (2009), apresentando perda de função em 21% dos indivíduos.

O MSH2 é um gene localizado no cromossomo 2p. Esse gene é homólogo da mutS, assim como o MSH6. Os produtos protéicos dos genes, hMSH2 e hMSH6 respectivamente, também atuam no sistema de reparação, de forma isolada ou em interação. A proteína hMSH2 tem função no reconhecimento de erros de pareamento. A mutação do hMSH2 está presente em aproximadamente 40% das famílias com síndrome de Lynch. Em relação a hMSH6, ela possui uma menor porcentagem em famílias com a síndrome, porém quando induzidas *in vitro*, as mutações levam as células afetadas a adquirirem o fenótipo maligno (COTTI *et al*, 2000).

A atuação dos genes ocorre em forma de complexo de heterodímeros, O complexo MSH2-MSH6 representa 80% a 90% do nível celular de MSH2, e sua função

é reconhecer o erro de pareamento, detectando inserções e deleções de um ou dois nucleotídeos, embora possa reconhecer sequências maiores (SILVA *et al*, 2009).

O gene MLH1 está localizado no braço do cromossomo 3, e é composto por 19 exóons. A proteína sintetizada por esse gene forma dímero com a proteína PMS2, e possui a função de coordenar a ligação entre outras proteínas envolvidas no sistema MMR (PINTO, 2010).

O processo de formação do câncer requer além da inativação do sistema de reparo, outras mutações em diferentes *loci* do genoma. A alteração nesses genes deixa o DNA em estado de hipermutabilidade, causando o fenótipo de instabilidade de microssatélites (MSI), que é determinado por sequências repetidas de uma forma aparentemente randômica ao longo do genoma (PARREIRAS *et al*, 2013).

Segundo Silva *et al* (2009), o diagnóstico da SL baseia-se primeiramente nos critérios de Amesterdam, que unificam a investigação clínica de famílias que apresentem possível suscetibilidade hereditária ao CCR. De acordo a revisão dos critérios em 1999, incluem-se também outros tumores do espectro da SL. Após essa seleção inicial de acordo com as características clínicas, os indivíduos são indicados para a determinação de mutação geminais. Sendo que 90% dessas mutações são identificadas como relacionadas aos genes MSH2 e MLH1, sendo as mutações no gene MSH6 menos frequentes.

A triagem para mutações geminais por sequenciamento é um processo demorado e oneroso, devido ao número de variações das mutações nos genes. Como forma de facilitar o acesso dos pacientes a esse diagnóstico, teste como determinação de Instabilidade de Microsatélite (MSI) e Imunohistoquímica (IHC) das proteínas produzidas pelos genes MMR, também têm sido utilizados.

Embora o MSI seja bastante sensível, não possui uma especificidade alta para LS, sendo que apenas um em cinco tumores com alto grau de instabilidade (MSI-H) está relacionado a defeitos no sistema de reparação. Como forma de complementação desse resultado, é possível realizar a IHC como teste complementar. Esse teste consegue identificar alterações no MMR através de coloração de amostra de tecido tumoral, sendo a ausência da expressão pela IHC o indicativo de perda de função do gene (ZEINALIAN, 2015).

Para os autores (LAWES *et al*, 2005; PROSCURSHIM *et al*, 2007; RAMSHOEK *et al*, 2009; BASHYAM *et al*, 2015; ZIADA-BOUCHAAR *et al*, 2016; ZUMSTEIN *et al*, 2016; MORENO-ORTIZ *et al*, 2016), a opção escolhida como forma para

determinação da função gênica foi a imunohistoquímica, enquanto o restante dos autores, escolheu o sequenciamento genético.

De acordo com os artigos avaliados, foi esquematizada uma tabela no qual apresenta as principais informações sobre os genes relacionados com a SL e o câncer colorretal referente a cada autor.

Tabela 1. Análise dos dados referentes aos diferentes autores, os genes estudados e os estudos realizadas por cada um deles.

Autor (ano)	Grupo estudado	N.	Coleta de dados	Genes (% N com perda da função)
Lawes et al (2005)	Indivíduos com CCR diagnosticados entre 1972-1997	55	Imunohistoquímica de amostra de tecido tumoral em parafina	MLH1 (10,9) MSH2 (1,8) MLH1/MSH2 (3,6)
Ferreira et al (2006)	Famílias com mutações nos genes MMR que apresentaram câncer	40	Amplificação e sequenciamento de DNA extraído de sangue periférico	MLH1 (55) MSH2 (42,5) MSH6 (2,5)
Proscurshim et al (2007)	Indivíduos tratados para CCR entre 1984-2004	15	Pesquisa de antígenos por IHC de anatomopatológico	MSH2 (0) MLH1 (0) MSH6 (6,6)
Rosa et al (2008)	Indivíduos pertencentes a famílias com SL com confirmação de CCR	25	Sequenciamento de DNA extraído de sangue periférico	MLH1 (8) MSH2 (16)
Ramshoek et al (2009)	Famílias com mutação nos genes MMR detectadas entre 1994-2007	67	Corte histológico de mutações genéticas em famílias com suspeita de LS	MLH1 (39) MSH2 (20) MSH6 (21)
Bashyam et al (2015)	Indivíduos com CCR e com suspeita da SL	48	Imunohistoquímica e sequenciamento genético realizada em amostra de tecido tumoral	MLH1 (25) MSH2 (25) MSH6 (29,2)
Ziada-Bouchaar et al (2016)	Indivíduos com suspeita da SL	21	Sequenciamento genético de	MSH2 (9,5) MLH1 (4,8) MSH6 (4,8)

			amostra de sangue periférico	
Zumstein et al (2016)	Indivíduos com CCR tratados entre 2011-2015	486	Corte histológico da imunohistoquímica feita após cirurgia	MSH6 (1,4) PMS2 (2,7) MSH2/MSH6 (11)
Germini et al (2016)	Indivíduos com CCR com 50 anos ou menos	45	PCR em tempo real de RNA extraído das amostras de tecidos tumoral	MSH6 (0) MSH2 (0)
Moreno-Ortiz et al (2016)	Indivíduos diagnosticados com a SL, sem relação familiar entre eles	3	Imunohistoquímica e sequenciamento de sangue periférico e amostra de tecido tumoral	MLH1 (66,7) MSH2 (33,3)

CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos, os genes MLH1 e MSH2 são os principais responsáveis pelo desenvolvimento da síndrome. Devido sua atuação em forma de complexo com o MSH2, o gene MSH6 demonstrou perda de função em vários dos artigos estudados, porém com uma menor prevalência. Para determinação dessa mutação os métodos utilizados foram imunohistoquímica e sequenciamento, não sendo utilizada a técnica de instabilidade de microsatélite, principalmente por sua baixa especificidade para a síndrome de Lynch.

REFERÊNCIAS

- BASHYAM M.D. et al. Evidence for Presence of Mismatch Repair Gene Expression Positive Lynch Syndrome Cases in India. **Molecular Cancer**, Kansas City, vol. 54, pág. 1807-1814, 2015.
- COTTI G.C.C. et al. Genética do câncer colorretal. **Rev Med**, São Paulo, vol. 79, n. 2/4, pag. 45-64, 2000.
- FERREIRA, JRO. **Caracterização funcional de variantes de patogenicidade incerta, MLH1 Leu676Pro e MSH2 Met729Ile, encontradas em pacientes diagnosticados com a síndrome de Lynch** (tese de Doutorado). São Paulo: Fundação Antônio Prudente, 2014.

FERREIRA S et al. Diagnóstico genético na síndrome de Lynch: implicações da localização de mutações geminais em genes de reparação do ADN. **GE J Port Gastroenterol**, Porto, vol. 13, pag. 82-88, 2006.

GERMINI D et al. HSMH2 and HSMH6 gene expression profiles in colorectal adenocarcinoma in patients up to 50 years of age. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, Atlanta, vol. 83, pag. 602-606, 2016.

LAWES D.A. et al. The role of MLH1, MSH2 and MSH6 in the development of multiple colorectal cancers. **British Journal of Cancer**, London, vol. 93, pag 472-477, 2005.

MORENO-ORTIZ J.M. et al. Novel mutations in MLH1 e MSH2 genes in Mexican patients with Lynch Syndrome. **Gastroenterology Research and Practice**, Cairo, 2016: 5278024, pag (6 páginas), 2016.

PARREIRAS, F.C. et al. Aspectos genéticos do câncer colorretal e seu impacto no manejo da doença. **Rev Med Minas Gerais**, vol 23, n 2, pag 221-227, 2013.

PINHEIRO C.I.F.P. Risco de carcinoma gástrico em famílias com Síndrome de Lynch (dissertação). Porto: **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**, 2014.

PINTO DT. The role of MLH1 constitutional methylation in Lynch syndrome (dissertação). Porto: **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**, 2010.

PROSCURSHIM I. et al. A expressão de genes reparadores do DNA nos tumores sincrônicos de câncer colorretal esporádico. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, vol 20, n 1, pag 12-16, 2007.

RAMSOEKH D. et al. Cancer risk in MLH1, MSH2 and MSH6 mutation carriers; different risk profiles may influence clinical management. **Hereditary Cancer in Clinical Practice**, pag (7 páginas), 2009.

ROSA I. et al. Importância e caracterização do carcinoma gástrico em famílias com diagnóstico ou suspeita de síndrome de Lynch. **GE J Port Gastroenterol**, vol 15, pag 56-62, 2008.

SCHNEIDER N.B. Análise do gene MSH6 em pacientes com síndrome de Lynch (dissertação). Porto Alegre: **Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2015.

SILVA, F.C.C. Frequência de mutações nos genes MSH6, PMS1, PMS2, TP53 e CHEK2 em pacientes com suspeita de síndrome de Lynch (tese). São Paulo: **Fundação Antônio Prudente**, 2011.

_____ et al. Mismatch repair genes in Lynch syndrome: a review. **Sao Paulo Med J**, vol 127, n 1, pag 46-51, 2009.

ZEINALIAN, M. et al. Immunohistochemical Analysis of Mismatch Repair Proteins in Iranian Colorectal Cancer Patients at Risk for Lynch Syndrome. **Iranian Journal of Cancer Prevention**, vol 8, n 1, pag 11-17, 2015.

ZIADA-BOUCHAAR H. et al. First description of mutational analysis of MLH1, MSH2 and MSH6 in Algerian families with suspected Lynch syndrome. **Springer Science**, pag (10 telas), 2016.

ZUMSTEIN V. et al. Systematic immunohistochemical screening for Lynch syndrome in colorectal cancer: a single centre experience of 486 patients. **Swiss Med Wkly**, vol 146, n 14315, pag (6 páginas), 2016.