



U. PORTO



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR
UNIVERSIDADE DO PORTO



centro hospitalar
do Porto

Mutação EPCAM e Síndrome de Lynch: genótipo e fenótipo

TESE DE MESTRADO

Porto, ano letivo 2016/ 2017

Regente: Professor Doutor José Barros

AUTOR: TIAGO JOSÉ MONTEIRO PAIS

ALUNO 6º ANO MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA, ICBAS, UNIVERSIDADE DO PORTO

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Marcos-Pinto
Departamento de Gastreenterologia, Centro Hospitalar do Porto, E.P.E.

Coorientador: Dr. Luís Maia
Departamento de Gastreenterologia, Centro Hospitalar do Porto, E.P.E.

Porto, 2017

Agradecimentos

Um especial agradecimento ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Marcos-Pinto e coorientador Dr. Luís Maia pela ajuda na escolha deste tema, pela sua disponibilidade e orientação, essenciais ao desenvolvimento deste trabalho e dos meus conhecimentos.

Aos meus pais e irmão, um enorme obrigado por acreditarem sempre em mim e por todos os ensinamentos que levo para a vida. Espero que esta etapa, que agora termino, possa, de alguma forma, retribuir e compensar todo o carinho, apoio e dedicação que, constantemente, me oferecem. A eles, dedico todo este trabalho.

Índice de Abreviaturas

CCR – Cancro Colorretal

CHP – Centro Hospitalar do Porto, E.P.E.

CIMP - *CpG island methylator phenotype*

DGS – Direção Geral de Saúde

MMR - *MismatchRepair*

EPCAM - Molécula de Adesão Celular Epitelial

IMS - Instabilidade de microssatélites

NCCN - *National Comprehensive Cancer Network*

PAF - Polipose Adenomatosa Familiar

PMYH - Polipose Associada ao gene *Mut Y homolog*

S.Lynch – Síndrome de Lynch

Abstract

Colorectal cancer (CRC) is the third cancer with the highest incidence in men and the second in women worldwide.

In Portugal, according to *Globocan*, in 2012 the CCR presented an incidence of 7129 new cases and mortality in 3797 cases.

Most CRCs are the result of sporadic cases, with family cases corresponding to 10% to 30% - Randall W. Burt, (2000). Lynch syndrome (S.Lynch), Familial Adenomatous Polyposis (PAF), and polyposis associated with the *Mut Y homolog* gene (PMYH) are the three most frequent hereditary CCR types, corresponding to 5% of the totality - Randall W. Burt , (2000).

S.Lynch is a hereditary non-polyposis CCR, due to an autosomal dominant inheritance with high levels of microsatellite instability, caused by germline mutations of the DNA mismatch repair (MMR) genes -MLH1 and MSH2, MSH6, PMS2 and, very recently discovered, mutations of the EPCAM (Epithelial cell adhesion molecule) gene that corresponds to 1-3% of the cases - Kuiper RP et al. (2013).

The use of the Amsterdam II and/or Bethesda criteria makes it possible to identify the families most likely to present S.Lynch for subsequent genetic testing.

This **thesis** presents a clinical case of a family that fulfills all the criteria of Amsterdam II and Bethesda. With a variety of neoplasms in the family tree - a very aggressive phenotype with carcinomas of the colon, rectum, stomach and small bowel – with negative classical germline mutations for S.Lynch, but with positive EPCAM mutation and an increased prevalence of gastric cancer compared to the international bibliography.

Resumo

O cancro colorretal (CCR) é o terceiro cancro com maior incidência nos homens e o segundo nas mulheres mundialmente.

Em Portugal, segundo dados da Globocan, em 2012 o CCR apresentou uma incidência de 7129 novos casos e uma mortalidade em 3797 casos.

A maioria dos CCR são resultado de casos esporádicos, sendo os casos familiares correspondentes a 10% a 30% - Randall W. Burt, (2000). A Síndrome de Lynch (S.Lynch), a Polipose Adenomatosa Familiar (PAF), e Polipose associada ao gene Mut Y homolog (PMYH) são os três tipos de CCR hereditários mais frequentes, correspondendo a 5% da totalidade - Randall W. Burt, (2000).

S.Lynch é um CCR não-poliposo hereditário, por uma herança autossómica dominante com elevados níveis de instabilidade de microssatélites, causada por mutações germinativas dos genes do tipo *MismatchRepair* (MMR) de ADN: - MLH1 e MSH2, MSH6, PMS2 e, muito recentemente descoberto, por mutação do gene EPCAM (Molécula de Adesão Celular Epitelial) que corresponderá a 1-3% dos casos - Kuiper RP et al. (2013).

A utilização dos critérios de Amsterdam II e/ou Bethesda permitem identificar as famílias com maior probabilidade de apresentarem S.Lynch para serem posteriormente sujeitos a testes genéticos.

Neste trabalho é apresentado um caso clínico de uma família que preenche todos os critérios de Amsterdam II e Bethesda com várias neoplasias na árvore familiar - fenótipo muito agressivo com carcinomas do cólon, reto, estômago e intestino delgado - com mutações germinativas clássicas para S.Lynch negativas, mas com mutação EPCAM positiva e uma prevalência aumentada de cancro gástrico em comparação à bibliografia internacional.

Materiais e Métodos

A pesquisa dos artigos científicos apresentados ao longo desta dissertação foi realizada através da consulta de dados na base eletrónica PubMed e UpToDate, usando os termos “*Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer*”, “*Lynch Syndrome*”, “*DNA mismatch repair genes*” e “*EPCAM*”. Restringiu-se aos artigos publicados nos últimos 15 anos em língua inglesa. A pesquisa bibliográfica terminou a 9 Maio de 2017.

O caso clínico apresentado é uma família estudada no Centro Hospitalar do Porto com a autorização do Conselho de Administração do Centro Hospital do Porto (CHP) após parecer favorável pela Comissão de Ética para a Saúde, pelo Gabinete do Coordenador de Investigação, pela Direção do Departamento de Ensino, Formação e Investigação do CHP e pelo Presidente do Conselho de Administração.

Palavras-Chave

- Cancro Colorretal;
- Cancro Colorretal não-poliposo hereditário;
- Síndrome de Lynch;
- Genes do tipo *MismatchRepair* de ADN;
- Mutação EPCAM.

Índice

Introdução	9
Cancro Colorretal	11
Manifestações Clínicas	11
Carcinogénese molecular e suas etapas a nível morfológico.....	12
Rastreio de CCR.....	14
Síndrome de Lynch.....	16
Diagnóstico de S.Lynch.....	17
Cuidados e rastreios após o diagnóstico de S.Lynch.....	20
Gene EPCAM.....	22
Caso Clínico	26
Discussão.....	29
Conclusão	30
Referências Bibliográficas	31

Introdução

Câncer é um crescimento celular descontrolado que pode invadir e metastizar por diversas vias para virtualmente qualquer órgão do corpo humano. Atualmente, é considerada uma doença genética adquirida e/ou induzida pela exposição a múltiplos carcinogêneos ambientais que causam danos cumulativos ao longo de vários anos, sendo, portanto, um processo constante e cumulativo.

Neste momento, o câncer é a principal causa de morte a nível mundial, com cerca de 8,2 milhões de mortes em 2012 (*World Cancer Report, (2014)*), onde o CCR foi responsável por cerca de 694 mil mortes (quarto câncer com maior mortalidade).

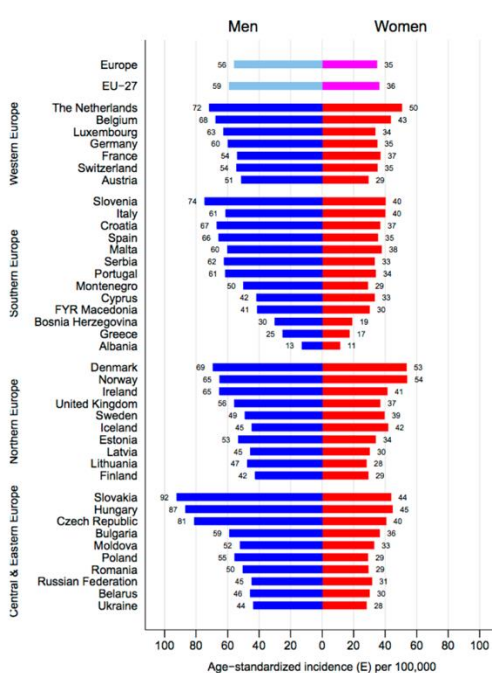


Fig. 6a. Age-standardised incidence rates by sex, area and country in Europe 2012: colorectal cancer.

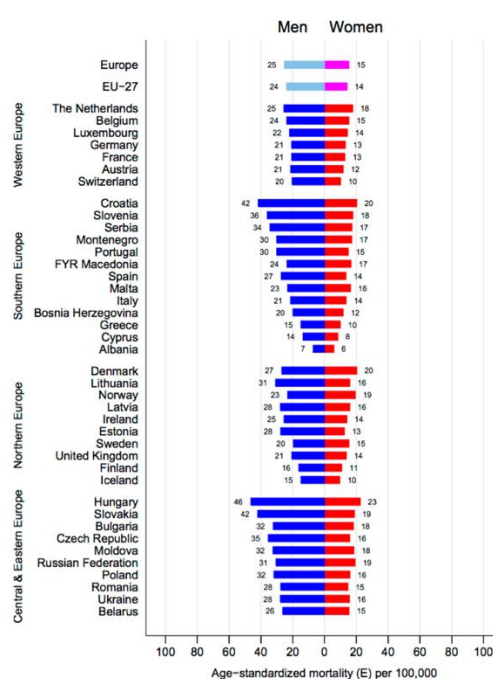


Fig. 6b. Age-standardised mortality rates by sex, area and country in Europe 2012: colorectal cancer.

Gráfico 1 - incidência e mortalidade do cancro a nível mundial –adaptado de Ferlay *et al.*, 2013.

O CCR é o terceiro cancro com maior incidência nos homens (746000 casos, 10.0% do total) e o segundo nas mulheres (614000 casos, 9.2% do total) mundialmente. Aproximadamente 55% dos casos ocorrem nos países mais desenvolvidos (total da população nos países desenvolvidos é, em 2015, cerca de 1200 milhões em 7300 milhões, logo 16.44% da população vive em países desenvolvidos e estes são responsáveis por 55% dos casos).

Contudo, nos últimos 10 anos a taxa de mortalidade do CCR diminuiu cerca de 20% devido aos avanços tecnológicos sobretudo nas técnicas de diagnóstico e cirúrgicas, mas também nas terapias radiológicas e farmacológicas neoadjuvantes e paliativas.

Em Portugal, segundo dados da *Globocan*, em 2012 o CCR apresentou uma incidência de 7129 novos casos – 61/100000 nos homens e 34/100000 nas mulheres - e uma mortalidade de 3797 casos – 30/100000 nos homens e 15/100000 nas mulheres -, colocando Portugal no pior quartil da Europa a nível de mortalidade (gráfico 1).

Cancro Colorretal

O CCR pode afetar qualquer indivíduo em qualquer idade de acordo com a sua etiologia. Aproximadamente 70% dos casos de CCR são denominados “esporádicos”, devido a mutações somáticas; 10% a 30% correspondem a casos “familiares” (doentes que não apresentam hereditariedade mendeliana, mas apenas predisposição familiar); aproximadamente 5% (Randall W. Burt, (2000)) corresponde ao grupo dos CCR hereditários - S.Lynch, PAF, e PMYH.

Vários fatores de risco estão associados a um aumento do risco de CCR: fatores não-controláveis como o *background* genético, idade, história familiar; a fatores controláveis/evitáveis como os fatores dietéticos (baixo consumo de frutas e vegetais, alimentos ricos em gorduras animais e pobres em fibras), obesidade, pouca atividade física, consumo de tabaco, álcool, terapia de reposição hormonal pós-menopáusia e utilização crónica de anti-inflamatórios não esteroides.

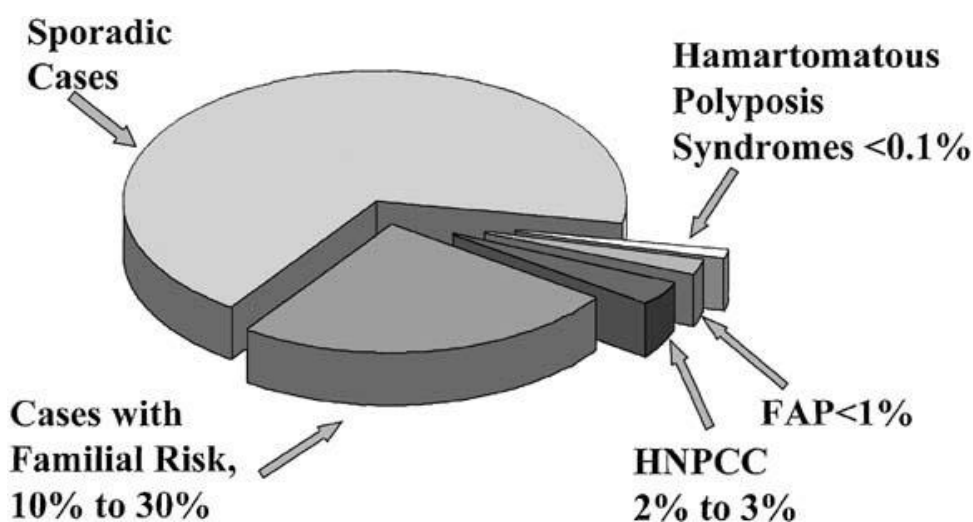


Gráfico 2 –Adaptado de Randall W. Burt (2000), subtipos de CCR e suas prevalências (em %)

Manifestações Clínicas

Quanto às manifestações clínicas, estas dependem do tipo e da localização da lesão, sendo as mais frequentes, a dor abdominal, alterações do ritmo intestinal, hemorragia sob forma de melenas ou retorragias, tenesmos, falsas vontades, emagrecimento, astenia, anemia, suboclusão/oclusão intestinal (De Rosa M *et al.* (2015)) - segundo Kekelidze M. *et al.* (2013), mais de 30% dos doentes com CCR são diagnosticados numa fase aguda com sintomas obstrutivos.

Pelo facto de os sintomas serem bastante inespecíficos, em 20% a 25% dos indivíduos com cancro do cólon e 18% dos doentes com cancro do reto apresentam metástases ao diagnóstico, sendo o fígado a localização mais comum, e 2,1% apresentam metástases pulmonares (com uma frequência três vezes superior nos doentes com cancro do reto em relação aos do cólon) - De Rosa M *et al.* (2015).

Quando à sintomatologia de acordo com a localização do tumor, os confinados ao cólon proximal têm tendência a serem mais volumosos, produtores de muco (com consequente diarreia), a manifestarem-se com melenas e anemia e com massa palpável nos quadrantes direitos. Por outro lado, os tumores do cólon distal têm tendência a serem tumores mais estenosantes, manifestando-se com dor tipo cólica e alterações do trânsito intestinal por oclusão e retorragias.

Carcinogénese molecular e suas etapas a nível morfológico

O CCR é uma doença heterogénea ao nível da sua carcinogénese molecular e das suas diversas etapas a nível morfológico.

Ao nível da instabilidade da carcinogénese molecular, esta pode ser subdividida em três vias distintas (Pancione M. *et al* (2012)):

1. **Instabilidade cromossómica** – caracterizada por alterações no número e estrutura cromossómicos associadas a desregulação sequencial de genes supressores tumorais e proto-oncogenes como, *APC*, *KRAS*, *DCC/SMAD4* e *TP53*. Geralmente ocorre em neoplasias hereditárias como PAF, estando também associado à maioria dos CCRs “esporádicos”.

2. **Instabilidade de microssatélites (IMS)** – caracterizados por alterações no número de repetições de nucleótidos localizados em exões (DNA codificável) e subsequentes mutações *frameshift* em genes supressores tumorais. É responsável pela S.Lynch e em 15% das neoplasias esporádicas principalmente por inativação genes do tipo *MismatchRepair* (MMR) de ADN: hMLH1, hMSH2, hMSH6 e hPMS2.

Neoplasias com este tipo de instabilidade tendem a ser mais prevalentes no cólon direito (proximal), associados a alto grau de displasia, fenótipo mucinoso e diagnosticados num estadio patológico mais baixo em relação às neoplasias associadas à instabilidade cromossómica.

3. **Instabilidade epigenética** (*CpG island methylator phenotype - CIMP*) – caracterizada por hipermetilação de inúmeros *loci* de promotores de “ilhas CpG” e consequente silenciamento de genes supressores tumorais.

Ao nível da instabilidade morfológica encontram-se igualmente estudadas três vias distintas: a “clássica”, a do carcinoma serreado e a “heterogênea” (Pancione M *et al.* (2012)) – figura 1.

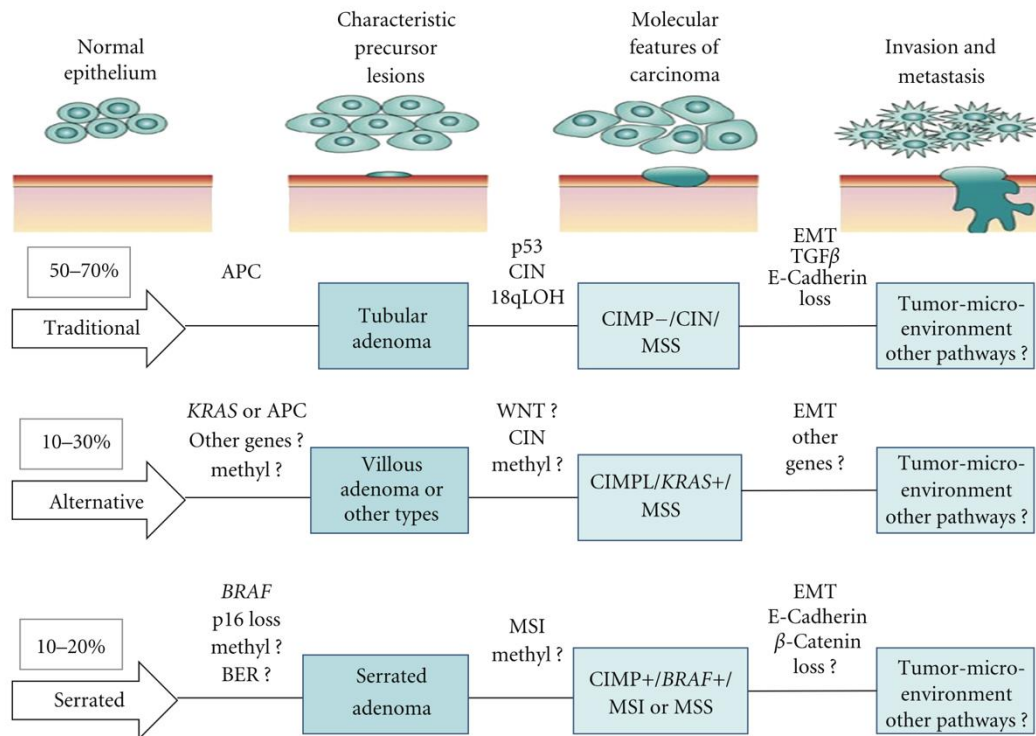


Figura 1 – adaptado de Pancione M *et al.* (2012)

A via “clássica” (sequência adenoma-carcinoma – modelo de Fearon e Volgestein - figura 2) – que enfatiza o papel principal dos pólipos adenomatosos como lesões precursoras de CCR.

Nesta via, como *primary event*, temos a ativação aberrante da via APC/β-catenina, seguido de mutações do RAS/RAF e perda da função do p53 na sua última etapa.

Mas, segundo Smith G, Carey FA, Beattie J, *et al.* (2002), dez anos mais tarde, apenas 7% dos CCRs apresentavam mutações nos três genes, implicando, por isso, múltiplas vias no processo de carcinogênese.

A via do carcinoma serreado surge de adenomas serreados sésseis, ou de adenomas serreados “típicos” (e por vezes de pólipos hiperplásicos caso haja mutação no oncogene *BRAF*). É caracterizado por um fenótipo com baixa instabilidade

epigenética, predominantemente com mutação *KRAS* mas ocasionalmente *BRAF* (se, raramente, associado a instabilidade cromossômica, apresenta pior prognóstico).

As grandes diferenças destas duas últimas vias morfológicas residem no facto de a clássica ter alta instabilidade epigenética e mutação *APC*; ao contrário da via do carcinoma serreado onde a instabilidade epigenética é incomum, as instabilidades de microssatélites e cromossômicas serem as instabilidades moleculares/genéticas predominantes e, nesta, a mutação *BRAF* a mais comum.

A via “heterogénea” que ainda não se encontra muito bem compreendida, mas afigurar-se um misto entre as duas vias supracitadas. Segundo Issa JP. (2008), esta pode surgir principalmente a partir de adenomas vilosos, mas também de adenomas serreados, tem uma forma diferente de CIMP, apresenta predominantemente mutação *KRAS*, e mutações *BRAF* ocasionais, geralmente não tem instabilidade cromossômica, e apresenta mau prognóstico aparentemente pela menor capacidade de resposta à quimioterapia.

A prevalência das três vias é de 10% a 20% (via serreada), 10% a 30% (da via heterogénea), e 50% a 70% (via clássica).

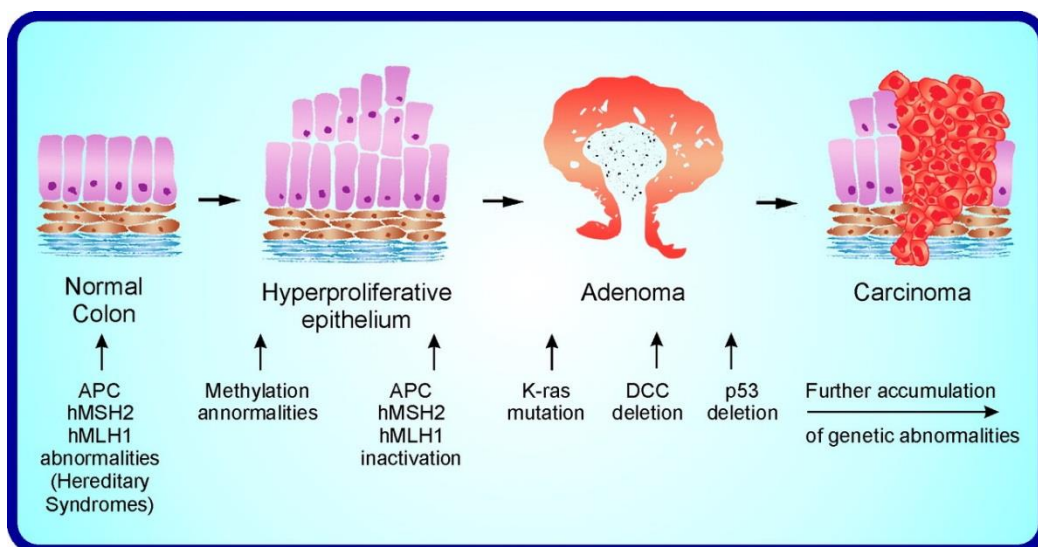


Figura 2 - Modelo Adenoma-Carcinoma de Fearon e Vogelstein, adaptado de Shams Burk (2010)

Rastreio de CCR

Os exames usados para o rastreio CCR são de dois tipos: aqueles que detetam tumores invasores, como a pesquisa de sangue oculto nas fezes, e que por isso reduzem apenas a mortalidade (mas não a frequência do cancro) e outros, ditos estruturais, que

identificam as lesões pré-malignas permitindo a sua remoção (como a colonoscopia total).

De acordo com a norma de 2014 da Direção Geral de Saúde (DGS) está previsto apenas a realização de rastreio oportunístico do CCR atrás da pesquisa de sangue oculto nas fezes a todos os utentes assintomáticos com idades compreendidas entre 50 e os 74 anos.

Contudo, o Ministério da Saúde, através do Despacho n.º 4771-A/2016, publicado em Diário da República no dia 7 de abril de 2016, determinou a implementação de rastreios de base populacional do cancro do cólon e reto, mas também da retinopatia diabética, cancro da mama e cancro do colo do útero,

Síndrome de Lynch

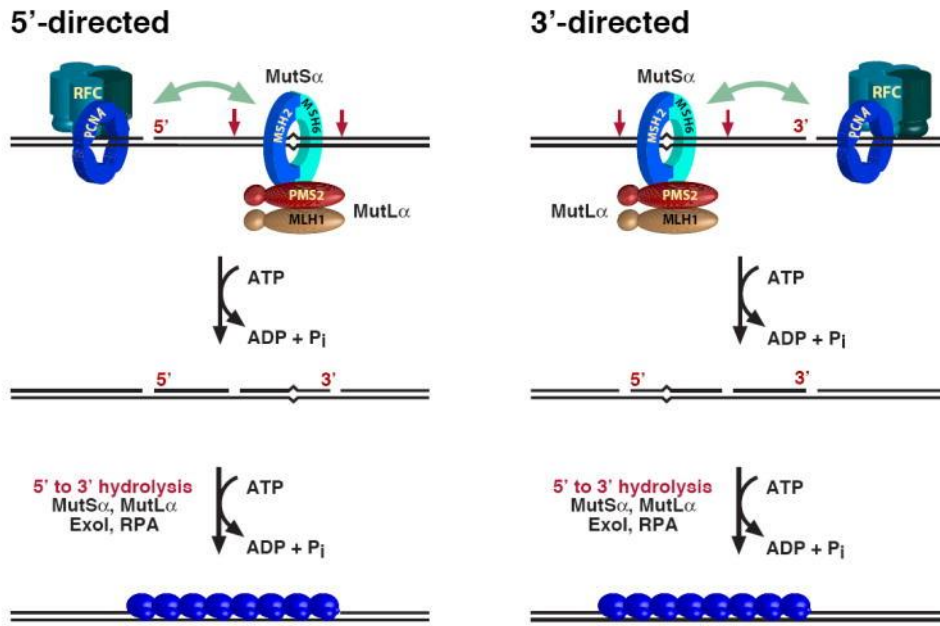
S.Lynch, também denominado CCR não associado a polipose hereditário, é uma doença autossômica dominante que se manifesta por lesões précancerosas (adenomatosas tubulares ou tubulovilosas) ou invasoras com elevados níveis de instabilidade de microssatélites, por mutações germinativas dos genes MMR - MLH1 e MSH2 (90%), MSH6 (7-10%), PMS2 (<5%) e, recentemente descoberta, a mutação do gene EPCAM que corresponderá a 1% a 3% dos casos (Kuiper RP *et al.* (2013)).

A principal função dos MMR é a correção de erros de replicação celular através da correção de *mismatches* de DNA durante a recombinação homóloga, suprimindo recombinações entre sequências semi-homólogas de DNA, iniciando uma resposta de sinalização para correção ou posterior apoptose (figura 3).

Com a inativação dos MMR, a formação de mutações espontâneas aumenta 10 a 1000 vezes predispondo, por isso, para a carcinogénese.

Esta síndrome é caracterizada por CCR em idades mais precoces que os “esporádicos”, em média, duas a três décadas (com predileção pelo cólon direito) e que inicialmente foi subdividido em duas variantes de acordo com as manifestações tumorais extra-cólicas:

- Lynch I: restrito ao cancro do cólon, onde apresentam grande frequência de tumores síncronos e cerca de 40% desenvolvem carcinomas metácronos ao fim de 10 anos;
- Lynch II: caracterizado por cancros em idades precoces em órgãos extra-cólicos: endométrio, ovários, trato urinário superior, intestino delgado, estômago, pele e sistema nervoso central; com elevada frequência de CCRs síncronos e metácronos.



Human mismatch repair

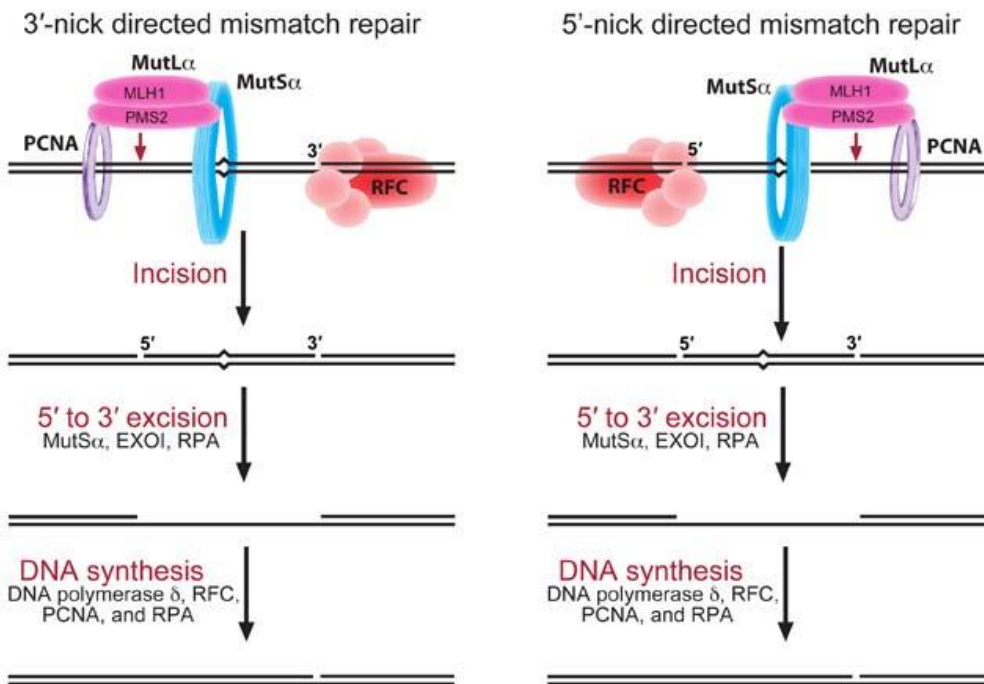


Figura 3 - função dos MMR de ADN, adaptado de Modrich P. (2006)

Diagnóstico de S.Lynch

Quanto ao diagnóstico de S.Lynch, este é realizado num processo de três etapas distintas, mas complementares: uma anamnese com uma história familiar de cancro o

mais alargada possível, histologia das neoplasias e, por último, testes genéticos e moleculares.

Explorando a história familiar, neste ponto as possíveis alterações genéticas ainda se encontram por identificar e caracterizar, por isso, a decisão baseada na história familiar e na idade do surgimento das neoplasias são a primeira etapa para identificar quais os casos com maior risco da doença. Na prática clínica são utilizados dois critérios - o Amsterdam II e o Bethesda – para sinalização das possíveis famílias afetadas:

Critérios Amsterdam II:

- três ou mais membros da família com cancros relacionados com o Síndrome de Lynch, nomeadamente, CCR, carcinomas do endométrio, do intestino delgado, do trato urinário superior de células de transição, do estômago, ovários, cerebrais (síndrome de Turcot) e adenomas das glândulas sebáceas ou queratoacantomas (síndrome de Muir-Torre); onde um ou mais indivíduos têm relação de primeiro grau com o probando;
- duas gerações afetados sucessivamente (um dos afetados em primeiro grau),
- um ou mais cancros relacionados com Síndrome de Lynch diagnosticados em idades inferiores a 50 anos,
- PAF excluída.

Critérios de Bethesda:

- CCR diagnosticado num indivíduo com idade inferior a 50 anos,
- Presença de CCR síncrono ou metácrono ou outros tumores relacionados com o Síndrome de Lynch, independentemente da idade,
- CCR ou outros cancros relacionados e com alto grau de instabilidade de microssatélites, diagnosticados em doentes com idade inferior a 60 anos,
- CCR diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com um tumor relacionado com Síndrome de Lynch, com um ou mais cancros diagnosticados num doente com idade inferior a 50 anos,
- CCR diagnosticado a 2 ou mais parentes de primeiro ou segundo grau com cancros relacionados com Síndrome de Lynch, independentemente da idade.

O diagnóstico clínico passa, portanto, pela aplicação inicial dos critérios de Amsterdam II e/ou Bethesda. Estes critérios são restritos para identificar famílias com S.Lynch e são especialmente desenvolvidos para identificação de famílias elegíveis para identificação genética inicial por imunohistoquímica do gene MMR causador da doença para posterior análise confirmatória. A sensibilidade e especificidade dos critérios de Amsterdam II e Bethesda para o diagnóstico de S.Lynch são 22% e 98% e 82% e 77%, respetivamente (Aung Ko Win, et al. (2016)).

Temos sempre de ter mente que se uma família não preencher estes critérios, poderão, mesmo assim em raros casos, apresentar uma mutação em pelo menos um gene MMR que poderá estar a ser segregado na família sem haver expressão da doença.

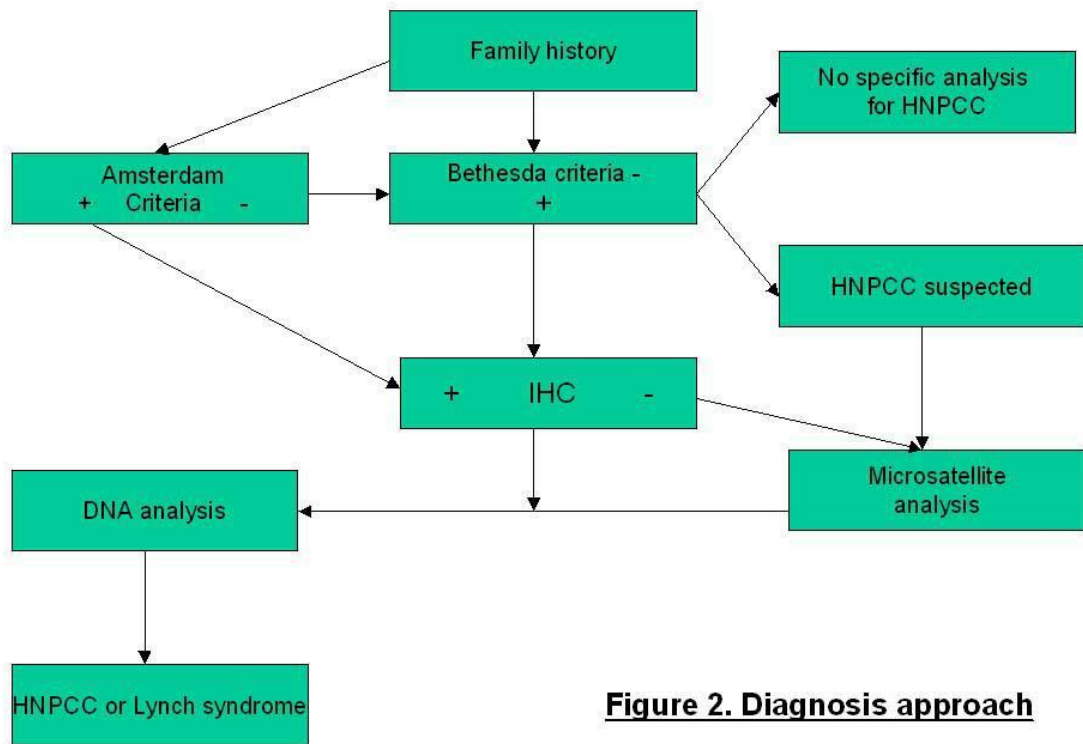


Figure 2. Diagnosis approach

Figura 3- Da suspeito ao diagnóstico de S.Lynch - adaptado de Juan Carlos Munoz (2015)

A pesquisa da mutação genética poderá apresentar diferentes resultados: nos doentes com neoplasias com IMS em múltiplos *loci*, é realizada pesquisa de mutações germinativas nos genes MSH2 e MLH1 (os mais frequentes), seguida, nos casos negativos, da pesquisa no gene PMS2.

No caso das neoplasias com instabilidade de microssatélite negativa ou positiva em apenas um locus, é realizada a pesquisa de mutações germinativas no gene MSH6, seguida da análise dos familiares em risco nos casos positivos.

Se estivermos perante todas as mutações germinativas clássicas para S. Lynch negativas, se deverá prosseguir à recente realização da pesquisa da mutação no gene EPCAM.

Cuidados e rastreios após o diagnóstico de S.Lynch

De acordo com as últimas *guidelines* da NCCN e tendo em conta os vários cancros gastrointestinais e extra gastrointestinais associados ao S.Lynch, a vigilância proposta para portadores das mutações dos genes MMR são:

Para CCR:

- Colonoscopia aos 20-25 anos ou 2-5 anos antes da idade de diagnóstico mais precoce na família caso seja um caso em idades inferiores a 20-25 anos.

Para cancro do endométrio:

- Histerectomia profilática e salpingo-ooforectomia poderá ser considerada em mulheres que não pretendem voltar a engravidar.
- Sensibilizar mulheres para as hemorragias uterinas anormais e disfuncionantes para uma avaliação rápida.
- Não está preconizado o rastreio de cancro do endométrio nem dos ovários, mas uma biópsia anual do endométrio poderá ser realizada, assim como ecografia transvaginal poderá ser considerada pelo médico assistente.

Outros cancros extracólicos:

- Indivíduos ou famílias com descendência asiática poderão ser considerados para endoscopia digestiva alta a cada 3-5 anos a partir dos 30-35 anos. Considerar tratar *Helicobacter pylori* caso seja positiva.
- Cancro urotelial: urianálise a partir dos 30-35 anos.
- Cancro do Sistema Nervoso Central: exame físico e neurológico a partir dos 25-30 anos anualmente.
- Cancro pancreático: apesar do risco aumentado não estão considerados testes de rastreio.
- Cancro da mama: rastrear tal como na população geral (rastreo populacional vigente em Portugal). Não há evidências de aumento de risco de cancro da mama.

Como se trata de uma doença autossômica dominante, deve-se indicar os portadores de mutação para consultas de aconselhamento genético da reprodução em caso de intenção de uma futura descendência.

Gene EPCAM

As deleções germinativas do gene EPCAM são responsáveis por 1% a 3% dos indivíduos com S.Lynch (Kuiper RP *et al.* (2013)).

O gene EPCAM está localizado no cromossoma 2 e codifica um antigénio associado a um carcinoma que é um membro glicosilado da família de duas proteínas de membrana do tipo I.

Em tecidos saudáveis, EPCAM encontra-se expresso em frequências diferentes e em órgãos diferentes: no trato gastrointestinal, o epitélio gástrico expressa baixos níveis de EPCAM, ao contrário do cólon onde a sua expressão no epitélio é alta (Balzar, M *et al.* (1999)).

EPCAM está implicado na adesão intercelular, na sinalização intracelular, na proliferação e diferenciação celulares e encontra-se localizado apenas na membrana basolateral de tecidos saudáveis, ao contrário dos tecidos neoplásicos onde esta proteína se encontra homogeneamente distribuída por toda a superfície celular (Katarzyna Tuttlewska *et al.* (2013)).

A ativação da sinalização EPCAM é mediada por proteólise intramembrana através da qual o domínio extracelular é endocitado e o domínio intracelular é libertado para o citoplasma (Katarzyna Tuttlewska *et al.*, 2013).

Desta forma, EPCAM vai fazer parte do complexo de sinalização *Wnt* em conjunto com os reguladores transcripcionais β -*catenina* e *Lef* (figura 4).

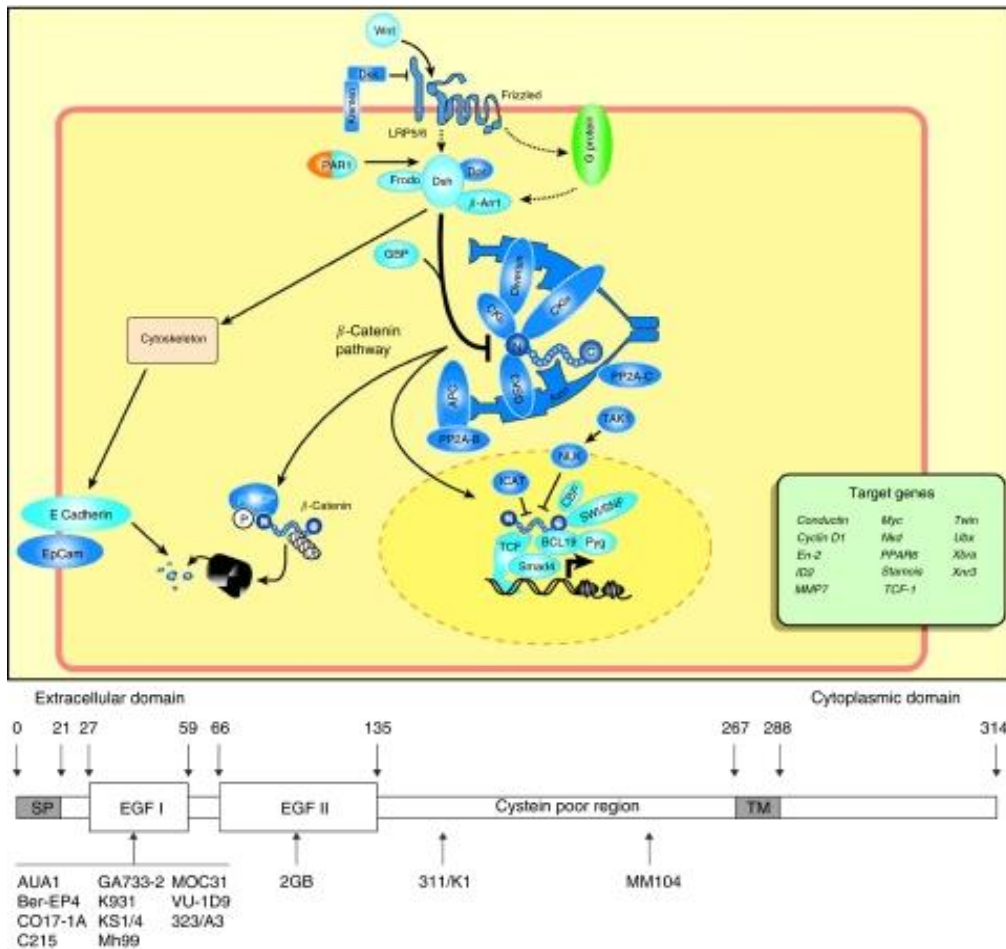


Figura 4- Adaptado de Huelsken and Behrens (2002) - Complexo Wnt, Lef, β-catenina

A nível genómico, o gene MSH2 encontra-se a 17kb a jusante do gene EPCAM no cromossoma 2 (figura 5). Deleções do gene EPCAM na porção terminal 3' conduzem a uma leitura transcripcional do alelo EPCAM mutado e inativação epigenética, e silenciamento do gene MSH2 causando, por inativação de um gene MMR, S.Lynch (*Katarzyna Tutlewska et al. (2013)*).

Esta inativação epigenética é restrita em células que expressam EPCAM, por isso, os doentes com deleções EPCAM, apresentam mosaicismos da inativação do gene MSH2, permitindo a distinção com os doentes com apenas mutações no gene MSH2 e explica as diferenças de ocorrência de diferentes tumores extra-cólicos, onde, por exemplo, a deleção terminal 3' do gene EPCAM está associada a um menor risco de cancro do endométrio em comparação com a deleção EPCAM-MSH2 e MSH2 (*Katarzyna Tutlewska et al. (2013)*).

Mesmo assim, o endométrio é dos órgãos extra-cólicos mais frequentemente atingidos (tabela 1).

TIPO DE CANCRO	RISCO DE CANCRO COM MUTAÇÃO EPCAM	RISCO PARA A POPULAÇÃO GERAL
Colorretal	52%-82%	1.9%
Endométrio	25%-60%	1.6%
Ovários	4%-12%	0.7%
Gástrico	6%-13%	0.3%
Intestino delgado	3%-6%	0.1%
Trato urinário	1%-7%	<1.0%
Pancreático	1%-6%	0.5%
Trato hepatobiliar	1.4%-4%	0.4%
Sistema Nervoso Central	1%-3%	0.4%
Neoplasias Sebáceas	1%-9%	<1.0%

Tabela 1 – Risco de cancro na mutação EPCAM - Giardiello FM. et al. (2016)

Reforçando a ideia de que o gene EPCAM se encontra expresso em grande quantidade no epitélio intestinal (principalmente cólon) e que este regula o gene MSH2, Kempers *et al.* (2011) demonstraram que o risco para CCR não difere entre os que tiveram deleção 3' do EPCAM em relação aos que tiveram a totalidade da deleção englobando EPCAM e MSH2.

Portanto, é de esperar que o risco dos diversos cancros associados à mutação do gene MSH2, sejam similares aos dos indivíduos com mutação EPCAM e, como tal, as *guidelines* de orientação para esta mutação sejam idênticas aos com a mutação MSH2.

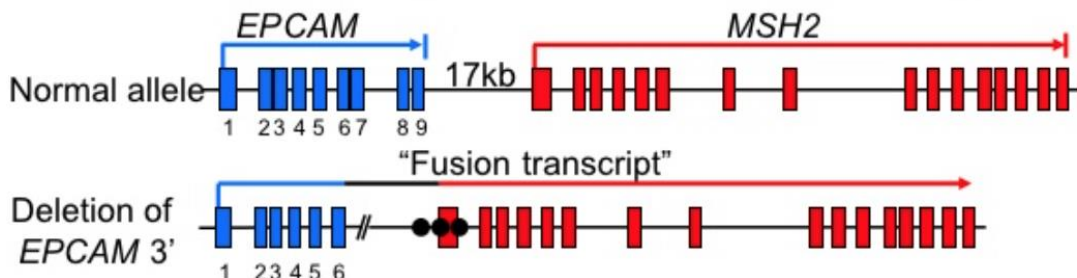


Figura 5 – proximidade do gene EPCAM e MSH2 e o resultado da deleção dos exões 8 e 9 – adaptado de John Burn (2011)

Caso Clínico

Uma família do norte de Portugal (figura 6), com várias neoplasias na árvore familiar foi estudada no Centro Hospitalar do Porto, EPE, em quatro gerações.

O probando, indivíduo do sexo feminino nascido em 1950 com diagnósticos sucessivos de neoplasias - cancro gástrico em 1992, cancro no cólon descendente em 1994, cancro do jejunum em 2001 e um cancro da tiroide em 2006 foi inicialmente estudado por história clínica com grande probabilidade de compatibilidade com S.Lynch.

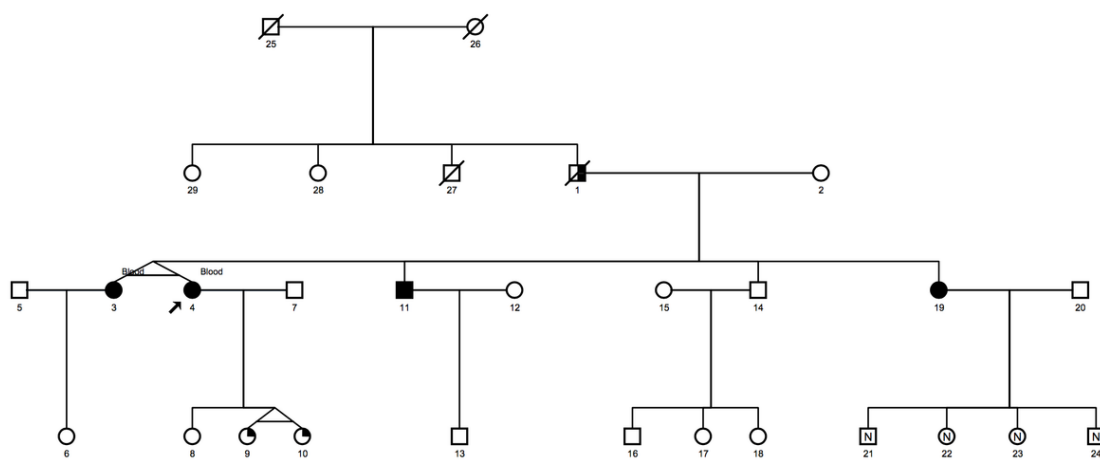


Figura 6- Genograma da família em estudo com mutação EPCAM (deleções nos exões 8 e 9)

Legenda:

1.JS; DN*-1915

- Cancro gástrico aos 39 anos

*DN: Data de Nascimento

3.MFC; DN*-1950

- Cancro colorretal 1982 (transverso)

- Cancro colorretal 2012 (reto)

- Cancro gástrico 2014

*DN: Data de Nascimento

4.MLCSR; DN*- 1950

- Cancro gástrico em 1992

- Cancro colorretal em 1994 (cólon descendente)

- Cancro do intestino delgado em 2001 (jejuno)

- Cancro da tiróide em 2006

*DN: Data de Nascimento

11. MICS; DN*-1948

- Cancro gástrico em 2009

*DN: Data de Nascimento

9. e 10.

Adenomas colorretais

19. MHCSA; DN*- 1944

- Cancro colorretal em 2004

- Cancro do intestino delgado em 2004

*DN: Data de Nascimento

Critérios de Amsterdam II	Cumpre o critério?	Observações
Três ou mais membros da família com câncros relacionados com o S.Lynch, nomeadamente, CCR, carcinomas do endométrio, do intestino delgado, do trato urinário superior de células de transição, do estômago, ovários, cerebrais (síndrome de Turcot) e adenomas das glândulas sebáceas ou queratoacantomas (síndrome de Muir-Torre); onde um ou mais indivíduos têm relação de primeiro grau com o probando	Sim	5 membros da família com câncros relacionados com o S.Lynch
Duas gerações afetados sucessivamente (um dos afetados em primeiro grau)	Sim	
Um ou mais câncros relacionados com S.Lynch diagnosticados em idades inferiores a 50 anos	Sim	Indivíduos 1(JS), 3(MFC) e 4(MLCSR) com câncros em idade inferior a 50 anos
PAF excluída.	Sim	

Critérios de Bethesda	Cumpre o critério?	Observações
CCR diagnosticado num indivíduo com idade inferior a 50 anos	Sim	
Presença de CCR síncrono ou metácrono ou outros tumores relacionados com o S.Lynch, independentemente da idade	Sim	

CCR diagnosticado em um ou mais parentes de primeiro grau com um tumor relacionado com S.Lynch, com um ou mais cancros diagnosticados num doente com idade inferior a 50 anos	Sim	Indivíduo 1 (JS)
CCR diagnosticado a 2 ou mais parentes de primeiro ou segundo grau com cancros relacionados com S.Lynch, independentemente da idade.	Sim	Indivíduos 1(JS), 3(MFC) e 4(MLCSR)

Analisando os critérios de Amsterdam II e Bethesda, todos os critérios foram cumpridos, permitido corroborar com as suspeitas de grande probabilidade de S.Lynch, sendo, portanto, uma família elegível para identificação genética causadora da doença.

Procederam-se aos estudos moleculares tumorais às mutações do genes MMR germinativas clássicas para S.Lynch- MLH1, MSH2, MSH6 e PMS2. Esta análise demonstrou-se negativa para todos.

Próximo passo foi a pesquisa da mutação EPCAM em novos estudos moleculares, através da pesquisa da deleção na região terminal dos exões 8 e 9 do gene EPCAM. Esta análise demonstrou-se positiva.

Após esta deteção, foram realizados estudos familiares com base nesta pesquisa tendo-se verificado que os indivíduos 3, 4, 11 e 19 apresentavam deleção na região terminal no gene EPCAM em homozigotia e que o indivíduo 1 era heterozigoto para essa mesma mutação.

Discussão

O caso clínico trata-se de uma família que preenche todos os critérios de Amsterdam II e Bethesda com várias neoplasias na árvore familiar - fenótipo muito agressivo com carcinomas do cólon, reto, estômago e intestino delgado - com mutações germinativas clássicas para S.Lynch negativas, mas com mutação EPCAM positiva.

Dada a prevalência de vários tipos de cancro associados ao S.Lynch, a vigilância para estes casos terá que ser ativa e rigorosa e de acordo com as *guidelines* da NCCN.

Há que destacar a possibilidade de rastreio de cancro do endométrio e dos ovários (risco de 25%-60% e 4%-12%, associados a EPCAM, respetivamente-Giardello FM. et al. (2016)), por biópsia anual do endométrio associada a ecografia transvaginal a todas as portadoras de mutação EPCAM devido ao seu risco aumentado em relação à população geral.

Nesta família há que salientar a especial vigilância por rastreio do cancro gástrico. Podemos constatar que há uma frequência aumentada de cancro gástrico em relação àquela divulgada em bibliografia internacional em indivíduos com mutação EPCAM (6% a 13%) - Giardiello FM. et al. (2016). Este dado poderá ser justificado por suspeita de uma mutação EPCAM diferente da detetada na literatura internacional; ou pelo CHP ter efetuada uma avaliação gástrica mais rigorosa e/ou um maior número de endoscopias digestivas altas com biópsias levando a maior incidência de diagnóstico de cancro gástrico; ou a incidência de *Helicobacter pylori* na família estudada seja superior em relação às famílias apresentadas em bibliografia internacional.

Conclusão

Com base na evidência descrita sugere-se a implementação por rotina da pesquisa das deleções no gene EPCAM em famílias suspeitas de S.Lynch.

Uma vez que o S.Lynch se trata de uma doença autossômica dominante onde existe uma grande panóplia de câncros primários além do CCR, é reconhecida a importância de uma vigilância apertada a todos os familiares atingidos não só pelo CCR, mas também, de acordo com as *guidelines* da NCCN, por outros câncros – por exemplo, 26% das mulheres são diagnosticadas com cancro do endométrio nos 10 anos seguintes ao diagnóstico de CCR (Obermair *et al.* (2010)).

A sinalização de indivíduos e famílias com mutação EPCAM irá permitir, num futuro próximo, a um melhor conhecimento da sua função génica assim como das implicações a nível prognóstico e de um futuro tratamento molecularmente dirigido precoce.

Do caso clínico apresentado, a prevalência de cancro gástrico detetada nesta família é superior à esperada em comparação à bibliografia internacional. Novos estudos deverão ser conduzidos para uma tentativa de esclarecimento desta constatação.

Referências Bibliográficas

Stewart BW, Wild CW (2014). World Cancer report 2014. IARC Nonserial Publication.

Globocan (2012)- “Estimated cancer incidence, mortality and prevalence Worldwide in 2012”. In: http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx

Ferlay *et al.* European Journal of Cancer 49, 2013, Pps. 1374–1403

Shams Burki (2010). Clinical Case: Old Man With Colonoscopic Findings Of Small Pedunculated Polyps In The Right Colon (2010). In <http://clinicalvignettes.blogspot.pt/2010/12/old-man-with-colonoscopy-findings-of.html>

Randall W. Burt, Gastroenterology (2000), Volume 119, Edição 3, Pps. 837-853.

De Rosa M, Pace U, Rega D, *et al.* (2015). “Genetics, diagnosis and management of colorectal cancer”. *Oncology Reports*. 34(3):1087-1096.

Kekelidze M, D'Errico L, Pansini M, Tyndall A and Hohmann J (2013). “Colorectal cancer: current imaging methods and future perspectives for the diagnosis, staging and therapeutic response evaluation”. *World J Gastroenterol*. 19:8502–8514.

Pancione M, Remo A, Colantuoni V. (2012) Genetic and Epigenetic Events Generate Multiple Pathways in Colorectal Cancer Progression. *Pathology Research International*. vol. 2012.

Fearon ER, Vogelstein B. (1990) “A genetic model for colorectal tumorigenesis”. *Cell*. 61(5):759–767.

Smith G, Carey FA, Beattie J, Wilkie MJ, Lightfoot TJ, Coxhead J, Garner RC, Steele RJ, Wolf CR (2002). “Mutations in APC, Kirsten-ras, and p53--alternative genetic pathways to colorectal cancer”. *Proc Natl Acad Sci U S A.*; 99(14):9433-8.

Issa JP. Colon cancer: it's CIN or CIMP. (2008) *Clinical Cancer Research*. 14(19):5939–5940.

Norma da Direção Geral de Saúde: Rastreio Oportunístico do Cancro do Cólon e Reto, 2014

Despacho n.º 4771-A/2016, in Diário da República, 7 de abril de 2016

Kuiper RP, Vissers LE, Venkatachalam R, Bodmer D, Hoenselaar E, Goossens M, Haufe A, Kamping E, Niessen RC, Hogervorst FB, Gille JJ, Redeker B, Tops CM, van Gijn ME, van den Ouweland AM, Rahnner N, Steinke V, Kahl P, Holinski-Feder E, Morak M, Kloor M, Stemmler S, Betz B, Hutter P, Bunyan DJ, Syngal S, Culver JO, Graham T, Ligtenberg MJ (2011) “Recurrence and variability of germline EPCAM deletions in Lynch syndrome”. *Hum Mutat*. 32: 407–14.

Modrich, P. (2006). Mechanisms in eukaryotic mismatch repair. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(41), 30305–30309.

Aung Ko Win, et al (2016) “Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer): Clinical manifestations and diagnosis”.

Munoz, Juan, (2015). “Hereditary Colorectal Cancer Clinical Presentation”.

Provenzale D, et al. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal. V 2.2016, in <http://www.nccn.org>.

Balzar, M., Winter, M., de Boer, C. et al. *J Mol Med* (1999) 77: 699.

Tutlewska K, Lubinski J, Kurzawski G. (2013) “Germline deletions in the *EPCAM* gene as a cause of Lynch syndrome” – artigo de revisão. *Hereditary Cancer in Clinical Practice*. 11(1):9.

Huelsken, J., and J. Behrens (2002). The Wnt signalling pathway. *J. Cell Sci*. 115:3977–3978.

Giardiello FM, et al. (2014). Guidelines on Genetic Evaluation and Management of Lynch Syndrome: A Consensus Statement by the US Multi-Society Task Force on Colorectal Cancer. *Am J Gastroenterol*.

Kempers MJ, et al. (2011) Risk of colorectal and endometrial cancers in *EPCAM* deletion-positive Lynch syndrome: a cohort study. *Lancet. Oncol*. 12:49-55.

Obermair A, Youlten DR, Young JP, Lindor NM, Baron JA, Newcomb P, Parry S, Hopper JL, Haile R, Jenkins MA (2010). Risk of endometrial cancer for women diagnosed with HNPCC-related colorectal carcinoma. *Int J Cancer*. 127:2678–84.

Jasperson, Kory W. et al. (2016) “Hereditary and Familial Colon Cancer.” *Gastroenterology* 138.6 (2010): 2044–2058.

Kim, Jung Ho et al. (2016) “Clinicopathologic, Molecular, and Prognostic Implications of the Loss of *EPCAM* Expression in Colorectal Carcinoma.” *Oncotarget* 7.12. 13372–13387.

John Burn (2011). Genetic and epigenetic analysis of sporadic colon cancer-Decision & treatment. Institute of Human Genetics, Newcastle University, UK Institute of Human Genetics Newcastle University Centre for Life, Newcastle UK.

T. Myrhøj, M. L. Blsgaard, I. Bernstein, L. B. Svendsen, J. O. Søndergaard & S. Bulow. (2009) “Hereditary Non-Polyposis Colorectal Cancer: Clinical Features and Survival Results from the Danish HNPCC Register”. Pps. 572-576.

Kohlmann W, Gruber SB. Lynch Syndrome. (2004) [atualizado 22 de Maio de 2014]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®*. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016.