



Universidade de  
Aveiro

2012

Departamento de Biologia

LILIANA ISABEL  
FERNANDES  
CAPELA

IDENTIFICAÇÃO DE *HOTSPOTS* NO GENE MYH



Universidade de  
Aveiro

2012

Departamento de Biologia

**LILIANA ISABEL  
FERNANDES  
CAPELA**

## **IDENTIFICAÇÃO DE *HOTSPOTS* NO GENE MYH**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Professor Doutor Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo, Professor Associado da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto e da Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos, Professora Auxiliar Convidada da Universidade de Aveiro.



## **o júri**

presidente

Professora Doutora Maria Helena Abreu Silva  
Professora Auxiliar, Universidade de Aveiro

arguente

Professor Doutor Fernando de Jesus Regateiro  
Professor Catedrático, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

orientador

Professor Doutor Sérgio Manuel Madeira Jorge Castedo  
Professor Associado, Faculdade de Medicina da Universidade do Porto

co-orientador

Professora Doutora Maria do Céu Gomes dos Santos  
Professora Auxiliar Convidada, Universidade de Aveiro

## **agradecimentos**

Aos meus pais, que sempre me incentivaram a investir na minha formação.

À minha irmã, pelo apoio incondicional em todas as situações.

Às colegas de trabalho pela constante transmissão de conhecimentos e disponibilidade em ajudar.

Ao Rui, o meu companheiro nos bons e maus momentos, pela ajuda sempre pronta, pelo alento, pela paciência, compreensão...

Aos meus orientadores, pela disponibilidade e transmissão de conhecimentos.

## palavras-chave

MYH, cancro colorretal, polipose, síndrome hereditária.

## resumo

A Polipose Associada ao MYH (MAP) é uma das síndromes de polipose cólica associadas a risco aumentado de cancro colorretal. Descoberta em 2002, a MAP é uma síndrome hereditária com transmissão autossómica recessiva. Causada por mutações bialélicas no gene MYH, a MAP é responsável por cerca de 0,5 - 1% dos carcinomas colorrectais. O gene MYH codifica a enzima MYH glicosilase que faz parte do sistema de reparação de DNA por excisão de bases (BER). O sistema BER desempenha um papel significativo na reparação de mutações causadas por espécies reativas de oxigénio (ROS).

Este estudo teve como principal objetivo determinar as frequências alélicas das mutações patogénicas detetadas numa série de 115 amostras consecutivas estudada no GDPN, de modo a delinear um protocolo laboratorial de rastreio de alterações do gene MYH eficaz, rentável e adequado. Através das técnicas de DGGE e sequenciação direta, foram detetados 29 casos com variações de sequência (excluindo polimorfismos conhecidos), em que as mutações *missense* p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp foram responsáveis por 72,2% dos alelos mutados. As outras mutações patogénicas encontradas foram a mutação *frameshift* c.1227\_1228dupGG, já detetada na população portuguesa e a deleção extensa dos exões 4 ao 16 [c.349-?(1650\_?)del], com apenas dois relatos na literatura. A maioria das restantes variantes encontradas, embora classificadas como “provavelmente patogénicas” por programas computacionais preditivos do efeito das mutações na proteína, ainda carecem de estudos funcionais para que possam ser definitivamente “rotuladas” de patogénicas.

Tendo em conta a variedade de mutações encontradas ao longo do gene e os casos de heterozigotia composta detetados, a melhor estratégia para o rastreio de alterações do gene MYH neste laboratório, deverá passar pelo estudo inicial dos exões 7 e 13 do gene, seguindo-se o estudo de toda a sequência codificante do gene em todos os casos negativos ou heterozigóticos para uma mutação patogénica. Por outro lado, nos pacientes portadores de mutação em aparente homozigotia ou heterozigotia deverá ser considerada a hipótese de uma análise adicional por MLPA no sentido de detetar/excluir a presença de grandes deleções/duplicações.

**keywords**

MYH, colorectal cancer, polyposis, hereditary syndrome.

**Abstract**

MYH-associated polyposis (MAP) is one of the colon polyposis syndromes associated with a significant increased CCR risk. Discovered in 2002, MAP is a hereditary syndrome with autosomal recessive transmission. Caused by biallelic mutations in MYH gene, is responsible for about 0.5 – 1% of colorectal carcinomas. The MYH gene encodes the enzyme MYH glycosylase, which is part of the DNA repair by base excision (BER). The BER system plays a significant role in the repair of mutations caused by reactive oxygen species (ROS).

This study aimed at determining the allele frequencies of MYH pathogenic mutations in order to devise an efficient, cost effective and suitable protocol for laboratory screening of MYH gene alterations. Using DGGE and direct sequencing 29 positive cases with MYH altered sequence (excluding known polymorphisms) were detected. Missense mutations p.Tyr179Cys and p.Gly396Asp accounted for 72,2% of mutated alleles. The other pathogenic mutations found were the frameshift mutation c.1227\_1228dupGG, already detected in the Portuguese population and the extensive deletion of exons 4-16 [c.349-? \_ (1650\_?)del], with only two reports in the literature. Most of the remaining variants found, although classified as “likely pathogenic” by computational programs predicting the effect of mutations in the protein, still lack functional studies in order to be definitively “labelled” as pathogenic.

Given the variety of mutations found throughout this gene and the detected cases of compound heterozygosity, the best strategy for the screening of the MYH gene in this laboratory should include the initial screening of exons 7 and 13, followed by the study of the entire coding sequence of the gene in all cases negative or heterozygous for a pathogenic mutation. Moreover, in patients who appear to be homozygous or heterozygous for a certain mutation further analysis by MLPA should be considered, in order to detect/exclude the presence of large deletions/duplications.

# ÍNDICE

Página

## INTRODUÇÃO

1. Epidemiologia do Cancro Colorretal .....	2
2. Fatores de risco .....	4
3. Base genética .....	5
3.1. Sistema de excisão de nucleótidos .....	6
3.2. Sistema de reparação de erros de emparelhamento .....	7
3.3. Sistema de excisão de bases .....	8
3.3.1. MYH.....	11
3.3.2. Interação entre o gene MYH e genes do MMR .....	13
4. Polipose associada ao MYH .....	14
4.1. Epidemiologia das mutações no gene MYH .....	16
5. Aconselhamento genético e profilaxia .....	19
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>

## MATERIAL E MÉTODOS

1. Material biológico .....	24
2. Métodos .....	24
2.1. Extração DNA .....	25
2.2. Análise quantitativa .....	25
2.3. <i>Polymerase Chain Reaction</i> (PCR) para amplificação .....	26
2.4. Análise qualitativa em gel de agarose .....	27
2.5. Purificação de produtos de amplificação .....	27
2.6. PCR-Sequenciação .....	27
2.7. Precipitação .....	28
2.8. Eletroforese capilar em sequenciador automático .....	28
2.9. Análise de sequenciações .....	28
2.10. Heteroduplexes .....	28
2.11. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) .....	29



2.12. Interpretação das mutações .....	30
2.13. <i>Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification</i> .....	31
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>33</b>
<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>40</b>
<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>46</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>48</b>
<b>ANEXOS</b> .....	<b>55</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

(ordenadas alfabeticamente)

AFE: Primeiros exões alternativos (*Alternative first exons*)

AP: local apurínico/apirimidínico

APS: Persulfato de amónio

BER: Reparação por excisão de bases (*Base Excision Repair*)

CCR: Cancro colorretal

DMSO: Dimetilsulfóxido

DNA: Ácido desoxirribonucleico

dNTP's: Desoxirribonucleotídeos trifosfatados

DGGE: Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (*Denaturing Gel Gradient Electrophoresis*)

EDTA: ácido etilenodiamino tetra-acético

F: sentido 5' – 3' (*Forward*)

FAP: Polipose Adenomatosa Familiar

HGVS: *Human Genome Variation Society*

HNPPC: Cancro Colorretal Hereditário Não Polipótico

MAP: Polipose Associada ao MYH

MLPA: *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*

MMR: Reparação de erros de emparelhamento (*Mismatch Repair*)

MTS: sinal de localização mitocondrial

NCBI: *National Center of Biotechnology*

NER: Reparação por excisão de nucleótidos (*Nucleotide Excision Repair*)

PAA: Poliacrilamida

PCNA: Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase (*Polymerase Chain Reaction*)

R: sentido 3' – 5' (*Reverse*)

RNAm: Ácido ribonucleico mensageiro

ROS: Espécies reativas de oxigênio

TAE: Tris-acetato-EDTA

TEMED: Tetrametiletilenediamina

U/F: Ureia/Formamida

UV: Ultravioleta

8-oxoG: 8-oxo-7,8-dihidroxi-2-desoxiguanosina

# INTRODUÇÃO

## 1. Epidemiologia do Cancro Colorretal

As neoplasias do cólon são importantes causas de morbidade e mortalidade nos Estados Unidos e em todo o mundo ocidental. Estes tumores são menos comuns em países subdesenvolvidos e no Extremo Oriente. A relevância dos tumores intestinais pode ser ilustrada pelos seguintes dados estatísticos (Damjanov, 2000):

- O cancro do cólon (CCR) é uma das três doenças malignas mais comuns, cuja incidência é apenas ultrapassada pela do cancro do pulmão em homens e do cancro do pulmão e cancro da mama em mulheres;

- Os tumores intestinais benignos superam em número os tumores malignos duas a três vezes. Dado que os tumores benignos podem evoluir para cancro, deverão ser removidos logo que sejam detetados.

Segundo dados do relatório da GLOBOCAN 2008 da Agência Internacional de Investigação do Cancro (IARC), em Portugal o CCR é a 2ª forma de cancro mais frequente, tendo sido detetados, em 2008, 6952 novos casos: 3951 casos em homens (56,8%) e 3001 casos em mulheres (43,2%). Estes números colocam Portugal na 14ª posição no ranking de países europeus com maior taxa de incidência de CCR (figura 1).

International Agency for Colorectum: both sexes, all ages

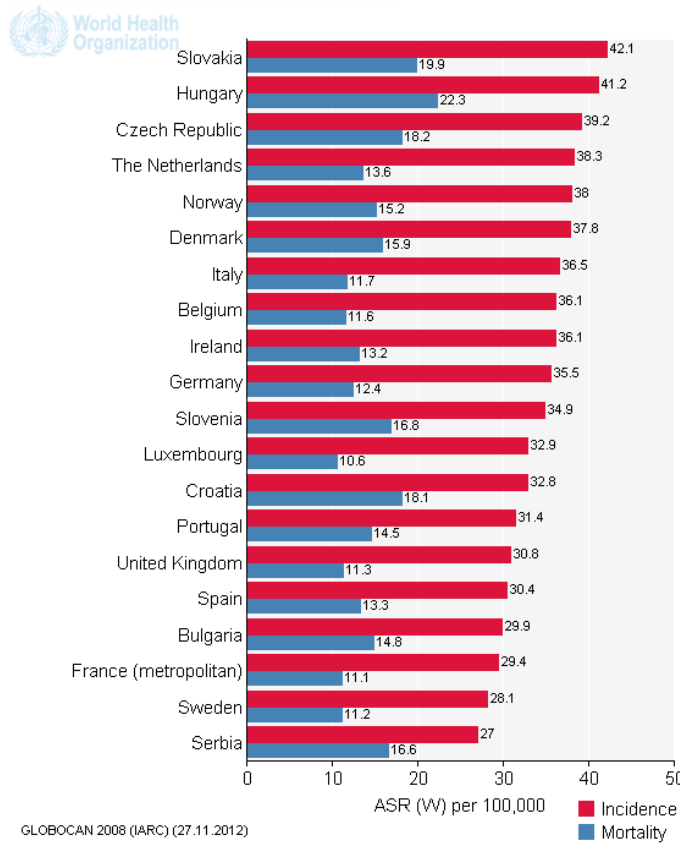


Figura 1 – Distribuição de incidência e mortalidade por CCR pela Europa (ambos os sexos, todas as idades).

Segundo este relatório, em 2008, esta neoplasia provocou 3691 mortes em Portugal. Prevê-se que em 2030 a mortalidade provocada por CCR tenha um aumento médio de 37,6% (figura 2).

International Agency for Research on Cancer

Portugal  
Colorectum  
Number of cancer deaths in 2030 (all ages)

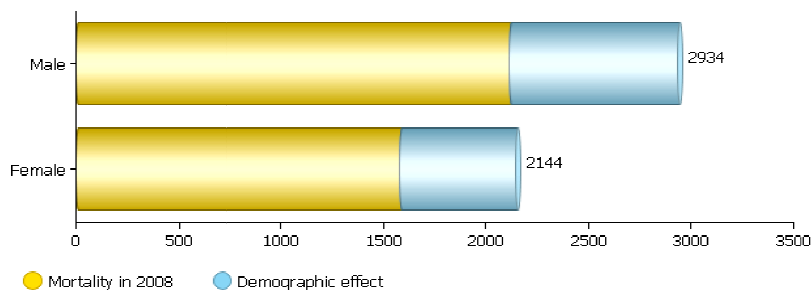


Figura 2 – Número previsto de mortes por CCR em 2030 (todas as idades).

O diagnóstico precoce e a vigilância periódica de pessoas em situação de risco são os únicos meios disponíveis atualmente de luta contra o cancro do cólon.

## **2. Fatores de risco**

Têm sido identificados vários fatores de risco genéticos e ambientais para o desenvolvimento de CCR. Estes incluem: idade, nutrição, atividade física, doença inflamatória intestinal e fatores genéticos (Brown, 2007).

Estima-se que até 80% dos câncros do cólon podem ser evitados através de mudanças na dieta (Cummings & Bingham, 1998). Os mecanismos de carcinogénese provocados pela dieta não estão totalmente esclarecidos, embora existam evidências circunstanciais suficientes para apontar alguns aspetos típicos das dietas ocidentais como as principais causas (Damjanov, 2000). O aumento do consumo de fibras sob a forma de frutas, vegetais e cereais foi proposto como fator protetor de CCR. Uma dieta rica em fibras aumenta o volume fecal e diminui o tempo de trânsito intestinal (Brown, 2007). Existem evidências que apontam para o facto de dietas ricas em carnes vermelhas ou processadas poderem aumentar o risco de CCR (Linseisen *et al*, 2002).

O folato demonstrou em vários estudos prospetivos de coorte ter um efeito protetor e a toma de suplementos de cálcio demonstrou levar à diminuição do risco de recorrência de adenomas. O selénio pode também ter um efeito anti-carcinogénico. Enquanto o álcool aumenta o risco para CCR, as evidências para o tabaco são inconclusivas (Brown, 2007).

Por outro lado, diversos estudos epidemiológicos têm destacado que homens fisicamente ativos têm um risco diminuído de desenvolver CCR relativamente a sedentários (Giovannucci & Willett, 1994). Embora, não exista uma relação consistente entre CCR e a obesidade, existe uma associação entre a obesidade e o desenvolvimento de adenomas (Brown, 2007).

Os doentes com doença inflamatória intestinal, colite ulcerosa ou doença de Crohn, têm um risco maior de desenvolver CCR do que a população em geral.

Os indivíduos que desenvolvem pólipos adenomatosos têm também um risco aumentado para CCR (Eaden *et al*, 2001).

Há uma série de fatores protetores, incluindo a aspirina e a terapia hormonal de substituição. Os inibidores da ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e as estatinas demonstraram também proporcionar alguma proteção em estudos populacionais (Brown, 2007).

No entanto, os fatores genéticos também desempenham um papel importante na patogénese do cancro intestinal. De todos os casos de CCR, 90-95% são esporádicos e, destes, cerca de 30% têm uma componente familiar ainda que sem uma causa monogénica identificada e apenas 5-10% dos casos são cancros hereditários, nos quais o mecanismo de transmissão hereditário foi determinado (Bolocan *et al*, 2011).

### **3. Base genética**

Atualmente, existem 3 síndromes hereditárias que demonstraram ter uma relação etiológica com o cancro colorretal: a Polipose Adenomatosa Familiar (FAP), o Cancro Colorretal Hereditário Não Polipóptico (HNPCC) e a Polipose Associada ao MYH (MAP) (Bolocan *et al*, 2011).

O genoma é sujeito a várias formas de stress e dano que podem levar a alterações na integridade do DNA. O núcleo da célula possui vários sistemas complexos e integrados de enzimas que identificam o DNA alterado e reparam-no ou, no caso de danos extensos, desencadeiam a morte celular (apoptose), o que impede a passagem de uma mutação para a próxima geração de células. Estes sistemas são essenciais para a replicação fiel do genoma, pelo que defeitos na linha germinativa destes sistemas dão origem às síndromes de cancro hereditário, cada uma com um espectro característico de neoplasia (Rodriguez-Bigas *et al*, 2010).

Dependendo do tipo de stress ambiental, podem existir múltiplas formas de dano do DNA, sendo também diversos os sistemas bioquímicos já identificados com atividades de reparação especializadas, tais como: o sistema de reparação



por excisão de nucleótidos, o sistema de reparação de erros de emparelhamento e o sistema de reparação por excisão de bases.

### **3.1. Sistema de excisão de nucleótidos**

O sistema de excisão de nucleótidos (NER) foi o primeiro sistema de reparação de DNA reconhecido e demonstrou ser essencial para a recuperação dos danos no DNA induzidos pela luz ultravioleta (UV) (Lans *et al*, 2010). Uma das características típicas deste dano consiste na geração de dímeros de pirimidinas, que se estabelecem através da ligação covalente entre resíduos de pirimidinas adjacentes e previnem a transcrição e replicação. O NER tem de quebrar a cadeia de DNA para iniciar a reparação, seguindo-se a excisão de segmentos maiores ou menores de DNA, à medida que a reação prossegue (Figura 3). Uma vez que existem várias enzimas diferentes envolvidas no NER, podem existir mutações germinativas em diferentes genes. Em humanos, as mutações homozigóticas inativadoras num dos genes envolvidos neste sistema reparador levam à completa perda de atividade do sistema NER causando a doença xerodermia pigmentar, por exemplo, na qual existe uma extraordinária sensibilidade à luz do sol (Rodriguez-Bigas *et al*, 2010).

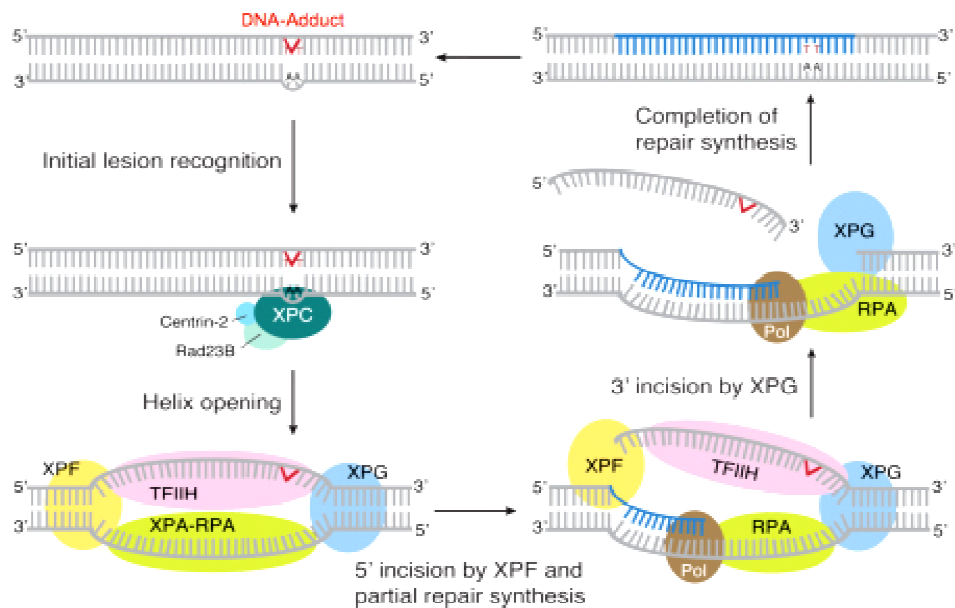


Figura 3 – O sistema de reparação por excisão de nucleótidos humano, é composto por múltiplas enzimas que eliminam o dano no DNA através de um mecanismo de corte e ressíntese (<http://www.vpt.uzh.ch/research/groupnaegeli.html>).

### 3.2. Sistema de reparação de erros de emparelhamento

O sistema de reparação de erros de emparelhamento (MMR) reconhece e repara danos no DNA que diferem, pelo menos em parte, dos danos reparados pelos sistemas NER e BER. Assim, os defeitos em cada um destes sistemas resultam num padrão distinto de mutações no DNA do tumor. Este sistema repara erros de replicação do DNA que ocorrem durante a fase S e heteroduplexes mal emparelhados durante a recombinação homóloga, que podem ocorrer durante a meiose em eucariotas. Os principais erros durante a fase S reconhecidos pelo MMR são simples emparelhamentos de bases errados e inserções/deleções mal emparelhadas que são acidentalmente criados pela DNA polimerase (figura 4) (Rodriguez-Bigas *et al*, 2010).

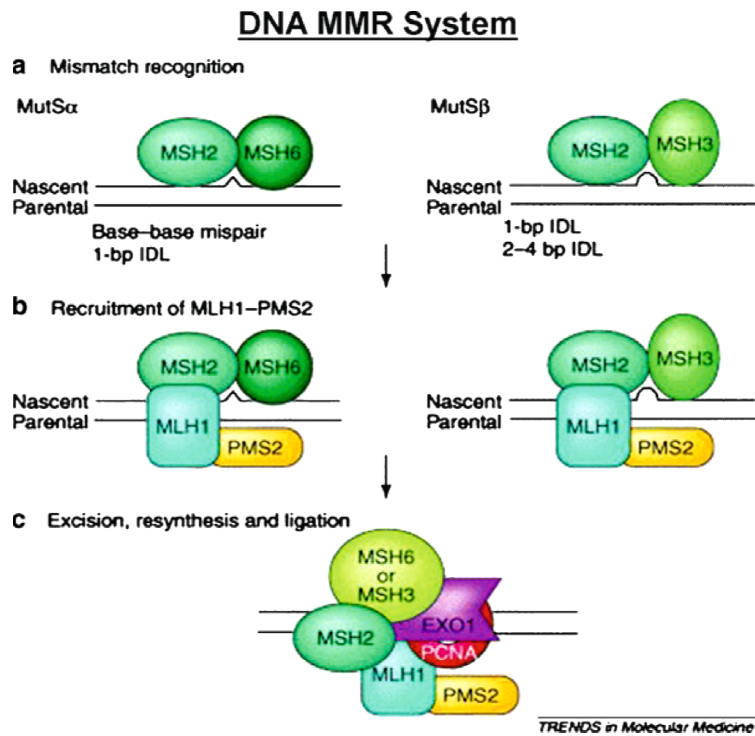


Figura 4 – Proteínas do sistema MMR. (A) À esquerda, o dímero MutS $\alpha$  de MSH2 e MSH6 reconhece e liga-se a um par de bases mal emparelhado. À direita, o heterodímero MutS $\beta$  tem especificidade para pequenas ansas de inserções/deleções (ou indels) de 1-4 bp. (B) Assim que ocorre a ligação dos dímeros de MutS à cadeia, o heterodímero MutL $\alpha$  de MLH1 e PMS2 é recrutado. (C) As proteínas MutS reconhecem o local do emparelhamento errado e juntamente com as proteínas MutL, interagem com o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) do complexo da replicação de DNA, e recrutam a exonuclease Exo1 para o complexo, que permite a excisão dos nucleótidos recentemente sintetizados, a ressíntese do DNA e a ligação entre os fragmentos de Okazaki (adaptado de Wei *et al*, 2002).

### 3.3. Sistema de excisão de bases

O sistema de reparação por excisão de bases (BER) inclui várias DNA glicosilases que removem bases de DNA danificadas ou alteradas, e restauram a sequência correta, complementar à cadeia molde inalterada.

O sistema BER desempenha um papel significativo na reparação de mutações causadas por espécies reativas de oxigênio (ROS) que são geradas

durante o metabolismo aeróbico. Este sistema é particularmente importante na reparação de locais apurínicos ou apirimidínicos que se desenvolvem espontaneamente sob condições fisiológicas numa base contínua. Este mecanismo protege também contra danos no DNA provocados por processos de metilação, hidroxilação, desaminação, e outros sub-produtos do metabolismo celular. O BER é um processo multi-etápico, que envolve a actividade sequencial de várias proteínas, entre elas DNA glicosilases. O sistema BER é geralmente iniciado por DNA glicosilases dano-específicas, que reconhecem as lesões e retiram as bases danificadas do DNA, através de clivagem da ligação N-glicosídica entre a desoxirribose e a base danificada. As DNA glicosilases podem ser classificadas de acordo com o seu mecanismo de ação em mono ou bifuncionais. Esta característica é que determina qual a sub-via da BER que será utilizada, a via de reparação curta ou longa (Kairupan & Scott, 2007).

A 1ª etapa é caracterizada pela ação de DNA-glicosilases específicas que reconhecem a base específica danificada, cliva a ligação N-glicosídica dando origem a um sítio apurínico/apirimidínico (AP). Após a clivagem da ligação fosfodiéster, o mecanismo BER pode prosseguir através de uma de duas diferentes vias: a via BER de reparação curta ou longa. Elas são diferenciadas pelo tamanho da abertura feita na cadeia de DNA pelas enzimas de reparação envolvidas em cada processo (Kairupan & Scott, 2007).

Embora as deficiências herdadas envolvendo o NER, o MMR ou outros mecanismos de reparação recombinada estejam todos relacionados com patologias genéticas humanas específicas, até ao início de 2002, nenhuma doença ligada ao BER tinha sido identificada (Hoeijmakers, 2001).

A 8-oxo-7,8-dihidroxi-2-desoxiguanosina (8-oxoG) é o produto mais estável gerado por ROS, capaz de produzir danos oxidativos no DNA (Ames & Gold, 1991). Quando livres, estas bases são incorporadas no DNA pelas polimerases e a não remoção da 8-oxoG antes da replicação resulta num emparelhamento incorreto desta base com uma adenina (Shibutani *et al*, 1991), provocando uma transversão de bases (G:C>T:A) em bactérias e leveduras (Nghiem *et al*, 1988; Michaels & Miller, 1992; Moriya & Grollman, 1993).

Na *Escherichia coli*, três enzimas ajudam a proteger as células contra o efeitos mutagênicos da oxidação da guanina: a MutM, a MutY e a MutT (Michaels & Miller, 1992). A DNA glicosilase MutM remove o par 8-oxoG:C da cadeia dupla de DNA, a MutY reconhece e remove as adeninas mal incorporadas e emparelhadas com a 8-oxoG e a MutT previne a incorporação na cadeia de DNA da 8-oxoG. O mecanismo de atuação destas enzimas encontra-se descrito na figura 5. Foram identificadas enzimas homólogas da MutM, MutY e MutT em células humanas, denominadas OGG1 (Roldan-Arjona *et al*, 1997), MUTYH (MYH) (Slupska *et al*, 1996) e MTH1 (Sakumi *et al*, 1993), respetivamente. Os produtos destes 3 genes de reparação por excisão de bases, MTH1 e OGG1 e MYH, agem sinergisticamente para prevenir a mutagénese induzida pela 8-oxoG.

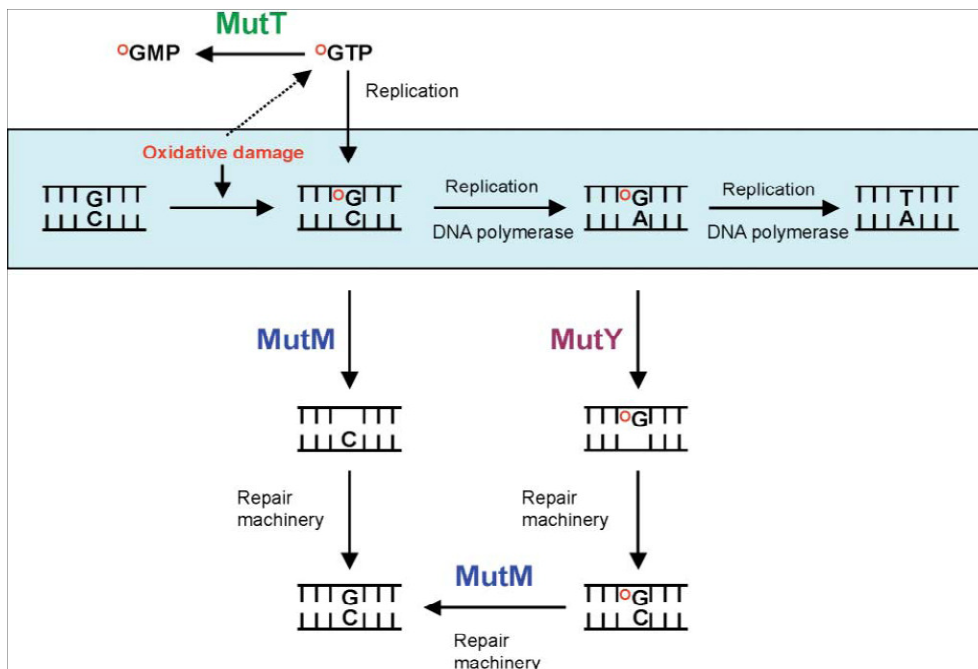


Figura 5 - O sistema de reparação da 8-oxoG na *E. coli*. A MutT, uma 8-oxo-dGTPase, impede a incorporação de 8-oxo-dGMP no DNA nascente, a DNA glicosilase MutM remove a base oxidada 8-oxoG: emparelhada com citosinas na cadeia dupla de DNA, e DNA glicosilase MutY excisa as bases adeninas mal incorporadas com bases 8-oxoG não reparadas durante a replicação. Em bactérias com defeitos nas enzimas MutM e MutY as bases 8-oxoG emparelham erradamente com adeninas e levam a mutações G:C>T:A (caixa azul). A 8-oxoG está designada por <sup>o</sup>G (adaptado de Rodriguez-Bias *et al*, 2010).

As DNA glicosilases humanas OGG1, MYH e MTH1, que são enzimas centrais do sistema BER, atuam especificamente no reconhecimento e remoção da 8-oxo-G (Cheadle & Sampson, 2003). O mecanismo específico de reconhecimento das DNA glicosilases é designado de “*base-flipping*”, envolvendo uma rotação dos nucleótidos para fora da hélice de DNA. Isto permite a incorporação destas bases através do seu encaixe em locais específicos das DNA glicosilases. O processo de reparação é subsequentemente completado através da síntese e incorporação de novos nucleótidos, através de várias etapas de reparação, que são facilitados por diversas enzimas de reparação da sequência de DNA (Nohmi *et al*, 2005).

### 3.3.1. MYH

A enzima MYH glicosilase, que faz parte do sistema BER, é codificada pelo gene MYH, localizado no cromossoma 1p (1p32.1-p34.3). O gene MYH é composto por 16 exões e 15 intrões, o qual poderá originar transcritos diferentes, que poderão ser traduzidos em polipeptídeos de 521 a 549 aminoácidos.

A enzima MYH reconhece uma incompatibilidade provocada pelo emparelhamento 8-oxoG:A e remove a base de adenina usando o mecanismo de “*base-flipping*”. Em menor grau, esta enzima reconhece e catalisa também outros emparelhamentos incorretos: G:A, C:A, 8-oxoG:G e 8-oxoA:G. A perda de atividade ou inativação da MYH glicosilase conduz a uma frequência anormalmente elevado de transversões G:C para T:A, resultando em mutações somáticas *nonsense* ou *splicesite* nos genes APC e/ou KRAS (Kastrinos & Syngal, 2007). O gene APC atua como um controlador (*gatekeeper*) da proliferação celular no cólon e, embora, mutações neste gene possam iniciar a formação de adenomas, são necessárias alterações somáticas adicionais para a progressão para carcinoma. A transição de adenoma inicial para intermédio está muitas vezes associada a uma mutação pontual no proto-oncogene KRAS (Jones *et al*, 2004). Este facto sugere uma reparação deficiente da 8-oxoG, um dos produtos mais deletérios do dano oxidativo do DNA, onde a 8-oxoG prontamente emparelha com resíduos de adenina levando a transversões na cadeia filha.

Quando eficaz, a MYH glicosilase oferece proteção contra este dano através da verificação de toda a cadeia após a replicação e remoção dos nucleótidos mal incorporados (Kastrinos & Syngal, 2007). Mais recentemente, esta enzima demonstrou também estar envolvida na iniciação da resposta apoptótica em resposta ao stress oxidativo, a qual estará comprometida quando a expressão da MYH está afetada (Oka & Nakabeppu, 2011).

O gene MYH apresenta *splicing* alternativo extenso. Foram já identificados transcritos deste gene, com primeiros exões distintos, que codificam proteínas distintas (Plotz *et al*, 2012). Estes primeiros exões alternativos (AFE's) levam à inclusão de uma sequência adicional num transcrito ou têm uma função regulatória se estiverem associados a diferentes promotores. No gene MYH verificam-se ambas as situações: um dos AFE's inclui uma sequência adicional que codifica um sinal de localização mitocondrial ( $\alpha$ ) e a expressão dos AFE's é variável, sendo dependente do tecido (Plotz *et al*, 2012).

Desta forma, já foram identificados mais de 10 transcritos do gene MYH, cada um com uma sequência na extremidade 5' ou um primeiro exão diferentes e cada um sendo sujeito a um *splicing* alternativo, que foram agrupados em transcritos  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$  (Kairupan & Scott, 2007). As proteínas codificadas por um RNAm  $\alpha$  possuem uma sequência de localização mitocondrial (MTS), que consiste num terminal de 14 codões que são necessários para estarem localizadas na mitocôndria, enquanto as proteínas codificadas pelos transcritos  $\beta$  e  $\gamma$  não têm essa MTS e, por isso, ficam localizadas no núcleo (Kairupan & Scott, 2007). Tal como foi determinado no estudo de Plotz *et al* (2012), os transcritos mitocondriais ( $\alpha$ ) são predominantemente formados em tecidos musculares, enquanto as proporções maiores dos transcritos nucleares ( $\beta$  e  $\gamma$ ) foram encontradas nos testículos e no cólon ascendente. Sendo o dano oxidativo do DNA mitocondrial a principal ameaça para as células musculares (ricas em mitocôndrias), isso explica o predomínio de transcritos mitocondriais neste tipo de tecido. Por outro lado, em tecidos onde predominam células proliferativas (como é o caso do sistema reprodutor) a necessidade de manter a integridade do DNA (e da replicação) é maior. Assim, se explica a maior proporção de transcritos

codificantes de proteínas MYH nucleares nos testículos e no cólon ascendente, o órgão-alvo de carcinogênese na MAP (Plotz *et al*, 2012).

No entanto, embora não esteja completamente esclarecido em que tecidos e a que nível estes transcritos são expressos, para prevenir confusão e para facilitar a anotação de todas as variantes de sequência do gene MYH, em 2009, a HGVS (*Human Genome Variation Society*) em colaboração com o NCBI (*The National Center of Biotechnology*) passou a recomendar o uso de uma sequência de referência que incluía teoricamente o maior transcrito conhecido, o  $\alpha 5$  (NG\_008189.1, NM\_001128425.1, NP\_001121897.1). Esta sequência de referência não representa, necessariamente, um transcrito natural existente. O seu principal objetivo é ser completo, e, assim, facilitar a descrição de todas as variantes possíveis. Esta alteração fez com que a nomenclatura das mutações até então descritas se modificasse, com a inserção de 42 nucleótidos após o nucleótido 157 (c.157). De acordo com a nova nomenclatura, as duas mutações c.494A>G (p.Y165C) e c.1145G>A (p.G382D), por exemplo, passaram a ser descritas como c.536A>G (p.Y179C) e c.1187G>A (p.G396D), respetivamente.

### **3.3.2. Interação entre o gene MYH e genes do MMR**

Presume-se que existe cooperação entre os sistemas BER e MMR, uma vez que experiências *in vitro* têm demonstrado que a enzima MYH interage fisicamente com o complexo de heterodímeros MSH2/MSH6 através de um domínio de ligação ao hMSH6 (Gu *et al*, 2002; Bai *et al*, 2005). Estes dois estudos demonstraram ainda que o complexo MSH2/MSH6 estimula a atividade da MYH glicosilase através do aumento da afinidade da MYH para emparelhamentos incorretos 8-oxo-G:A no DNA.

Em 2006 Niessen *et al*, sugeriram que a presença de portadores monoalélicos de mutações *missense* no gene MYH combinada com mutações *missense* nos genes MMR, em particular no MSH6, leva a um aumento do risco para CCR. No entanto, esta associação não foi encontrada para outros autores (Steinke *et al*, 2008).



#### 4. Polipose associada ao MYH

Descoberta em 2002, a polipose cólica associada ao MYH (MAP) é uma síndrome hereditária com transmissão autossômica recessiva. Tem penetrância quase completa e expressão variável (Bolocan *et al*, 2011). É causada por mutações bialélicas no gene MYH e é responsável por cerca de 0,5 - 1% dos carcinomas colorretais e por 10-30% dos casos de polipose cólica (Claes *et al*, 2011).

Em 2002, Al-Tassan *et al*. demonstraram a associação entre defeitos no gene MYH e a predisposição para a polipose cólica. A suspeita da existência de defeitos nos genes responsáveis pelo sistema BER surgiu quando 11 tumores de 3 irmãos com polipose revelaram ter mutações somáticas no gene APC, a maioria transversoões G:C>T:A, consistentes com a presença de um sistema BER deficiente, não tendo sido detetada nenhuma mutação no gene APC. Ao ser feita a análise molecular destes genes, foi constatada a presença de duas mutações, p.G382D e p.Y165C (atualmente p.G396D e p.Y179C, respetivamente), no gene MYH.

Os pacientes com esta síndrome podem desenvolver dezenas a centenas de adenomas e CCR entre a 5ª e 6ª década de vida. Existe, no entanto, a possibilidade de o número de adenomas ascender aos milhares ou, pelo contrário, ocorrer desenvolvimento de CCR na ausência de múltiplos adenomas. O diagnóstico clínico dos pacientes com MAP é feito, em média, entre os 45 e 50 anos, sem diferenças significativas entre os sexos (Poulsen & Bisgaard, 2008).

Existem vários estudos que descreveram a possibilidade de manifestações extra-cólicas desta síndrome, nomeadamente adenomas duodenais e pólipos gástricos, serem relativamente comuns (Sampson & Jones, 2009). Outros estudos tentaram estabelecer uma associação entre esta síndrome e outras patologias, como por exemplo, cancros da mama, estômago, endométrio, bem como com melanomas, adenomas sebáceos, osteomas, tumores desmóides entre outros, mas devido às reduzidas amostragens usadas e às baixas frequências obtidas, estas conclusões devem ser tidas em consideração com alguma reserva. Assim, mais estudos são necessários para clarificar se existem (e em caso afirmativo,

quais) manifestações extra-cólicas como consequência de mutações bialélicas no gene MYH, sendo provável que a presença destas manifestações não seja característica típica desta síndrome, embora possam ocorrer nalguns doentes (Poulssen & Bisgaard, 2008).

Embora o risco de desenvolvimento de CCR seja significativo nos portadores bialélicos de mutação no gene MYH, a questão de saber se os indivíduos portadores monoalélicos de mutação têm um risco aumentado de desenvolver CCR continua muito debatida e ainda sem resposta definitiva. Tudo indica que a presença de mutações monoalélicas germinativas no gene MYH pode estar associada a fenótipos de polipose. No entanto, só estudos comparativos com amostragens maiores e utilizando métodos estatísticos adequados poderão conseguir obter uma conclusão clara quanto a essa associação (Poulsen & Bisgaard, 2008). Já no que diz respeito à associação entre mutações monoalélicas e CCR, enquanto uns autores sugerem que a percentagem de portadores monoalélicos de mutação no MYH é maior em pacientes com CCR do que em populações controlo (Olschwang *et al*, 2007), o que apontaria para uma potencial associação entre a presença de uma mutação em heterozigotia e o risco de CCR (Croitoru *et al*, 2004; Tenesa *et al*, 2006), outros falharam na observação dessa associação (Peterlongo *et al*, 2005). Assim, ainda que os portadores monoalélicos de mutação no gene MYH possam ter um maior risco para CCR, esse acréscimo de risco deverá ser ligeiro (Shinmura *et al*, 2012).

Uma das teorias que procura explicar o aumento do risco para CCR nos portadores monoalélicos de mutações no MYH, é a perda de heterozigotia para o cromossoma 1p, onde se localiza o gene MYH. Segundo este modelo, a perda do alelo normal do cromossoma 1p no gene MYH em portadores monoalélicos de mutação, poderá contribuir para um aumento do risco para CCR (Poulsen & Bisgaard, 2008), embora esta teoria careça de mais estudos que a comprovem.

O papel exato das mutações germinativas monoalélicas no gene MYH na tumorigénese do CCR continua incerto, mas aceita-se, tal como mencionado

anteriormente, que as interações com outros genes, como por exemplo genes do sistema MMR, sejam possivelmente relevantes.

#### 4.1. Epidemiologia das mutações no gene MYH

Na base de dados Insight (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*) é possível ter uma visão global das mutações da linha germinativa mais frequentemente identificadas no gene MYH até à data (<http://www.LOVD.nl/MUTYH>).

Existe um grande número de mutações descritas como provavelmente patogénicas tendo a maioria das quais sido reportada numa variedade de combinações bialélicas em pacientes com MAP. Das mutações que constam na base de dados atrás referida, 9% representam mutações *splice-site* (distribuídas pelos intrões 1, 4-6, 8, 10, 11, 12 e 15), 64% mutações *missense*, 11% mutações *nonsense*, 12% pequenas inserções ou deleções *frameshift* e as restantes (<5%) inserções ou deleções *in-frame*. Com a exceção das extremidades 3' e 5' do gene MYH, as mutações estão distribuídos ao longo de toda a sequência codificante (Rodriguez-Bigas *et al*, 2010).

Foram encontradas mutações específicas no gene MYH em diferentes populações (figura 6).

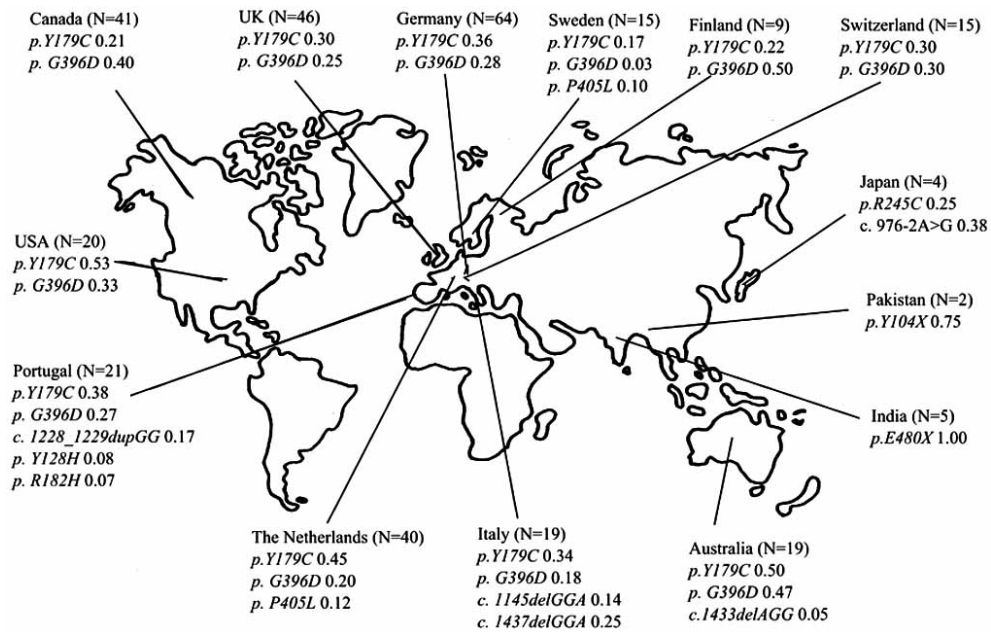


Fig. 6 – Frequências alélicas médias em portadores de mutações no gene MYH (adaptado de Poulsen & Bisgaard, 2008).

À medida que mais estudos recorrem à sequenciação completa do gene MYH e mais populações são estudadas, uma imagem mais fiel da distribuição de mutações associados à MAP tem vindo a ser obtida (Rodríguez-Bigas *et al*, 2010).

As mutações *missense* p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp (anteriormente conhecidas como p.Tyr165Cys e p.Gly382Asp) são, respetivamente, dez e sete vezes mais prevalentes em pacientes com MAP do que qualquer outra mutação e ocorrem predominantemente na população ocidental. Considerados estes *hotspots* do gene, juntos eles representam 70% das mutações reportadas (Rodríguez-Bigas *et al*, 2010). As frequências alélicas das mutações p.Tyr179Cys (ou p.Y179C) e p.Gly396Asp (ou p.G396D) encontradas entre os pacientes com MAP são significativamente superiores às frequências encontradas em populações controlo (figura 7).

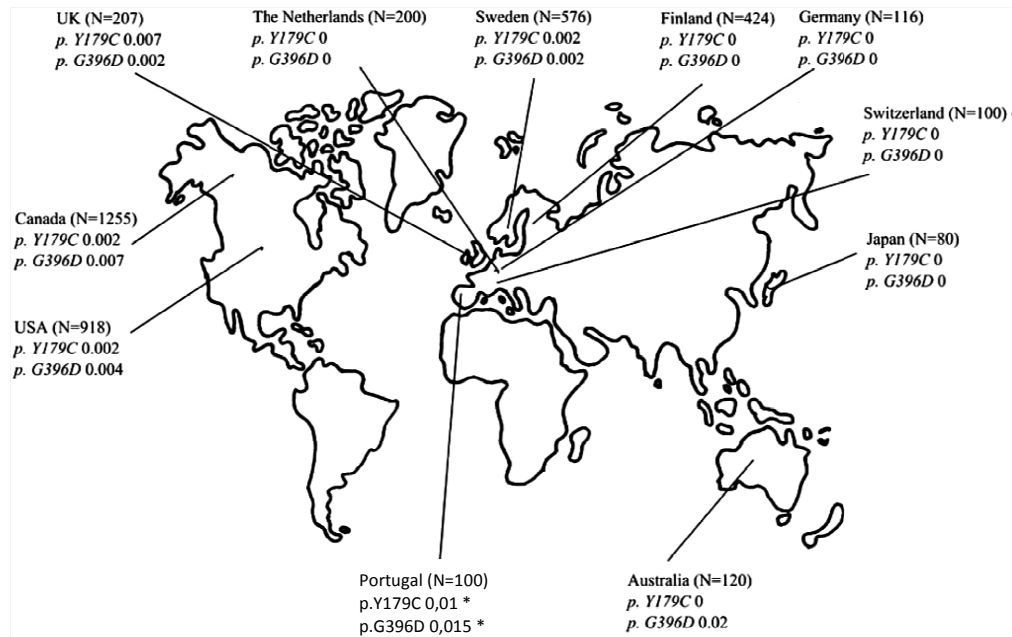


Fig. 7 - Frequências alélicas médias das mutações p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp em populações controlo (adaptado de Poulsen & Bisgaard, 2008).

\* Frequências diferentes das mencionadas no artigo de Poulsen, 2008.

Em populações asiáticas, as mutações p.Tyr179Cys e p. Gly396Asp nunca foram encontradas em doentes com polipose, nem nas populações controlo correspondentes (Tao *et al*, 2008). As mutações características dos pacientes japoneses com polipose incluem, por exemplo, a mutação *missense* p.Arg245Cys e a mutação *splice site* c.976-2A>G, nenhuma das quais encontradas na população controlo correspondente (Miyaki *et al*, 2005).

Foram identificados 3 pacientes indianos com MAP, não relacionados entre si, homocigóticos para a mutação *nonsense* p.Glu480X e um paciente paquistanês homocigótico para a mutação *nonsense* p.Tyr90X (Jones *et al*, 2002; Kumar *et al*, 2008). No entanto, num estudo caso-controlo de pacientes indianos com polipose, apenas foram encontrados um caso (1/120) e um controlo (1/100) heterocigóticos para mutação p.Glu480X e nenhuma outra mutação no gene MYH foi detetada (Dolwani *et al*, 2007). Estes resultados sugerem que as mutações no gene MYH não são causa frequente de polipose nos indianos. Num estudo efetuado numa amostragem de pacientes com polipose da Coreia, também não foram encontradas mutações no gene MYH (Kim *et al*, 2006).

Outras variantes do gene MYH encontradas com frequências alélicas significativas noutras populações são: as mutações *frameshift* c.1103delC e c.1395\_1397del (encontrada em pacientes italianos com MAP), a mutação *missense* c.1376C>A (p.Ala473Asp) (encontrada em pacientes finlandeses) e a mutação *frameshift* c.1186\_1187insGG (p.E396fsX437) (encontrada em pacientes portugueses com MAP) (Aceto *et al*, 2005; Gismondi *et al*, 2004; Alhopuro *et al*, 2005; Leite *et al*, 2005; Isidro *et al*, 2004; Poulsen & Bisgaard, 2008).

## 5. Aconselhamento genético e profilaxia

Frequentemente, os pacientes com MAP já apresentam CCR no momento do diagnóstico clínico, por vezes, antes de o tratamento profilático poder ser iniciado. O rastreio e aconselhamento genético de indivíduos em risco é essencial, já que permitirá a adopção de medidas preventivas. Neste contexto, é importante que a constante atualização do conhecimento sobre a doença e modo de transmissão possa ser usado na organização de recomendações clínicas, que assegurem o melhor seguimento e tratamento destes pacientes.

As diretrizes para a gestão clínica dos pacientes com MAP, sugerem a realização de uma colonoscopia a cada 2 anos, começando aos 18 - 20 anos de idade. Também faz parte do protocolo de vigilância a realização de uma endoscopia alta entre os 25 e 30 anos de idade. Os intervalos recomendados entre cada rastreio dependem da gravidade da doença de acordo com o determinado pela classificação de Spigelman. Esta classificação permite o estadiamento da polipose, tendo em conta o tamanho e número de pólipos, características histológicas e grau de displasia (Karsten *et al*, 2005). O tratamento cirúrgico da polipose é também descrito nas orientações. Se o número de adenomas for pequeno, estes pólipos podem ser removidos endoscopicamente em alguns pacientes. Quando o número e extensão dos pólipos requer cirurgia é necessária, a colectomia total com anastomose íleo-retal deverá ser suficiente, na maioria dos casos, para eliminar o risco de desenvolver cancro (Vasen *et al*, 2008).

Por outro lado, importa também apostar no estudo do gene MYH, tornando-o tão eficiente quanto possível, sem pôr em causa a qualidade do resultado obtido, nem diminuir a eficácia na deteção das possíveis mutações patogénicas, essenciais para a identificação dos indivíduos em risco de desenvolver esta síndrome.

# **OBJETIVOS**



Este trabalho teve como objetivos:

- 1- Determinar a frequência alélica das variações de sequência não polimórficas detetadas no gene MYH em doentes com polipose cólica para os quais foi solicitado estudo genético.
- 2- Identificar possíveis *hotspots* de mutações patogénicas no gene MYH.
- 3- Delinear um protocolo laboratorial de rastreio de mutações do gene MYH eficaz, rentável e adequado.

# **MATERIAL E MÉTODOS**

## 1. MATERIAL BIOLÓGICO

Neste estudo foram utilizadas amostras de sangue periférico de doentes com diagnóstico de polipose adenomatosa. A amostra utilizada foi constituída por uma série consecutiva de casos recebidos pelo laboratório GDPN – Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal para efeitos de estudo genético de MAP, no período de Agosto de 2009 a Agosto de 2012. O grupo de pacientes incluídos neste estudo foi constituído por 76 homens e 39 mulheres, com idades compreendidas entre 21 e 85 anos, sendo a idade média à data do estudo genético de 56,6 anos (mediana: 57 anos).

As amostras de sangue periférico foram colhidas em tubos estéreis com anticoagulante EDTA e entregues no laboratório para processamento até 24 horas após a colheita.

Um total de 115 casos foi submetido a um rastreio de mutações nas regiões codificantes e transições intrão-exão do gene MYH.

## 2. MÉTODOS

Este rastreio consistiu na realização do seguinte protocolo laboratorial sequencial:

- extração de DNA
- quantificação da concentração de DNA por espectrofotometria
- PCR para amplificação de todos os exões codificantes do gene
- análise qualitativa do produto de PCR através de eletroforese em gel de agarose

Após estas etapas, todos os fragmentos do gene foram analisados por *Denaturing Gel Gradient Electrophoresis* (DGGE) à exceção de um único fragmento (designado 14b) que foi analisado por sequenciação direta.

No fragmento analisado por sequenciação direta seguiu-se o seguinte protocolo sequencial:

- purificação dos produtos de amplificação
- PCR - sequenciação
- precipitação e desnaturação dos produtos
- eletroforese capilar em sequenciador automático

- análise das sequenciações

Nos fragmentos analisados por DGGE seguiu-se o seguinte protocolo sequencial:

- heteroduplexes dos produtos de amplificação
- corrida em DGGE
- coloração com brometo de etídio
- análise dos géis
- sequenciação dos fragmentos com um padrão eletroforético anormal – alterações no padrão de migração eletroforética, aparecimento de bandas de heteroduplexes (o que implica reamplificação do fragmento em causa, purificação do produto de amplificação, PCR - sequenciação, precipitação e desnaturação, corrida no sequenciador e análise da sequenciação).

Nos casos com ausência de produtos de amplificação ou suspeitos de hemizigotia, foi realizada uma técnica adicional o PCR *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA).

Segue-se uma descrição mais detalhada de cada uma das etapas do protocolo referidas.

### **2.1. Extração DNA**

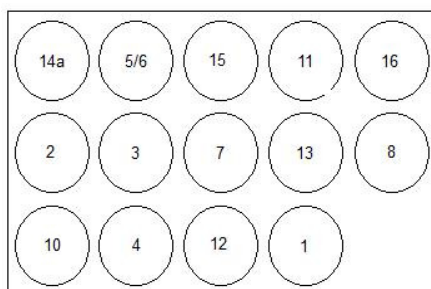
O DNA foi obtido a partir de 400 µL de amostra de sangue periférico total seguindo o protocolo do QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit otimizado para sangue e fluidos corporais automatizado para o extrator automático QIAcube (QIAGEN<sup>®</sup>).

### **2.2. Análise quantitativa**

A concentração de DNA obtida foi determinada por leitura espectralométrica (SmartSpec<sup>™</sup> Plus - BioRad) a 260 nm, de forma a usar a fórmula:  $Abs_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{fator de diluição}$ , para calcular a concentração de DNA a µg/mL, tendo como referência que uma unidade de densidade ótica a 260 nm corresponde aproximadamente a 50 µg/mL de DNA de cadeia dupla.

### 2.3. Polymerase Chain Reaction (PCR) para amplificação

Para amplificar os fragmentos relevantes do gene (exões e transições exão-intrão) foi efetuado um PCR em placa de 96 poços, no qual foram usados 5  $\mu\text{L}$  dos *primers* (F + R) a 3 pmol/ $\mu\text{L}$  (sequência dos *primers* em Anexos - I), distribuídos segundo o esquema seguinte:



A reação de amplificação foi efetuada num volume final de 25  $\mu\text{L}$ / poço de solução contendo os seguintes reagentes:

5x GoTaq® Reaction Buffer (Promega)	6,0 $\mu\text{L}$
dNTP's (GE Healthcare)	1,2 $\mu\text{L}$
MgCl <sub>2</sub> (Promega)	1,8 $\mu\text{L}$
GoTaq® Flexi DNA Polymerase (Promega)	0,2 $\mu\text{L}$
DMSO (Amersham Biosciences)	3,0 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	variável (até perfazer 25 $\mu\text{L}$ )
DNA	variável (100 ng/ poço)

A amplificação dos fragmentos 9 e 14b foi feita num PCR adicional, usando *primers* específicos num volume final de 25  $\mu\text{L}$  de solução contendo:

5x MyTaq™ Reaction Buffer (Bioline)	6,0 $\mu\text{L}$
MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline)	0,25 $\mu\text{L}$
<i>Primer</i> (3 pmol/ $\mu\text{L}$ )	5 $\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O	variável (até perfazer 25 $\mu\text{L}$ )
DNA	variável (100 ng/ poço)

O programa de PCR utilizado no termociclador foi:

3 min 94°C	
1 min 94°C	} 5 ciclos
1 min 60°C	
1 min 72°C	
1 min 94°C	} 5 ciclos
1 min 57°C	
1 min 72°C	
1 min 94°C	} 30 ciclos
1 min 60°C	
1 min 72°C	
5 min 72°C	

#### 2.4. Análise qualitativa em gel de agarose

A presença do produto de PCR específico foi verificada através de eletroforese em gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio e visualizado com UV's num transiluminador.

#### 2.5. Purificação de produtos de amplificação

A purificação dos produtos de amplificação foi realizada segundo o protocolo do GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Illustra™) com o intuito de remover sais, enzimas, nucleótidos e *primers* não incorporados.

#### 2.6. PCR-Sequenciação

A reação de sequenciação foi efetuada utilizando o BigDye® Terminator sequence kit version 1.1 (Applied Biosystems), num volume final de 10 µL de solução contendo, por tubo:

Terminator Ready Reaction Mix	1,0 µL
BigDye Sequencing Buffer	1,9 µL
<i>Primer</i> (1,6 pmol/µL)	2,0 µL
H <sub>2</sub> O	Variável (até perfazer 10 µL)
Produto PCR	Variável

O programa de PCR utilizado no termociclador foi o seguinte:

1 min 96°C	}	25 ciclos
10 seg 96°C		
5 seg 50°C		
4 min 60°C		

## 2.7. Precipitação

Com o objetivo de retirar o excesso de didesoxinucleótidos marcados, didesoxinucleótidos não marcados e *primers* não incorporados, os produtos da reação de sequenciação são colocados numa coluna contendo Sephadex® Gel Filtration Media (GE Healthcare) e centrifugados 4 min a 4440 rpm. Após transferência para tubos de sequenciador foram submetidos a desnaturação química por ação de 12 µL de formamida (Applied Biosystems) adicionada a cada produto numa *hotte*.

## 2.8. Eletroforese capilar em sequenciador automático

Os produtos foram corridos no ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer, que se baseia no método de Sanger.

## 2.9. Análise de sequenciações

As sequenciações obtidas foram analisadas e comparadas com a sequência de referência do gene MYH (nº acesso GenBank: NM\_001128425.1).

## 2.10. Heteroduplexes

O princípio desta técnica assenta no facto da cadeia dupla de DNA poder ser separada através da desnaturação. Do mesmo modo, também pode ser renaturada, ou seja, reassociar-se para formar uma homoduplex. Mas se houver uma mutação numa das cadeias, a renaturação das cadeias mutadas não será completa e, por isso, para além das cadeias homoduplexes, formar-se-ão também as cadeias heteroduplexes (cadeias com uma diferença conformacional devida à mutação e que impede o seu emparelhamento total com a cadeia complementar). Estas propriedades do DNA podem ser exploradas para deteção de mutações

pontuais, uma vez que as cadeias heteroduplexes tendem a mover-se mais devagar num gel de poliacrilamida em relação às cadeias homoduplexes o que facilita a sua deteção.

Para aumentar a quantidade de cadeias heteroduplexes, uma etapa de formação de heteroduplexes foi realizada depois da amplificação de todos os fragmentos a serem analisados por DGGE. Esta consistiu em submeter a placa de 96 poços (contendo todos os fragmentos amplificados) a um programa de desnaturação (10 minutos a 96°C) seguida de renaturação a uma temperatura baixa (45 minutos a 54°C) para permitir ligações inespecíficas e a formação de heteroduplexes.

Após a etapa de formação de heteroduplexes, os fragmentos foram agrupados em *pools* de fragmentos com padrões de migração diferentes, para evitar a sua sobreposição no gel, como indicado a seguir:

*Pool A*: 14a + 2 + 10

*Pool B*: 5/6 + 3 + 4

*Pool C*: 15 + 7 + 12

*Pool D*: 11 + 13 + 1

*Pool E*: 16 + 8

*Pool F*: 9

### **2.11. Eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE)**

A eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) permite detetar diferenças no comportamento de *melting* de fragmentos de DNA, que diferem apenas numa única base. Quando um fragmento de DNA é submetido a um meio ambiente físico cada vez mais desnaturante, ele desnatura parcialmente. À medida que as condições de desnaturação se tornam mais extremas, o fragmento parcialmente desnaturado dissocia-se completamente em cadeias simples e sofre uma forte redução de mobilidade, devido à sua mudança de forma. Os desnaturantes usados são físicos (a temperatura) e químicos (soluções de diferentes concentrações de formamida (F) e ureia (U)). A posição no gradiente



onde o fragmento de DNA desnatura e praticamente pára a migração é dependente da sequência de nucleótidos da região desnaturada. Diferenças na sequência de dois fragmentos aparentemente iguais, fá-los desnaturar em diferentes posições no gradiente e assim parar a migração no gel em diferentes posições. Comparando o comportamento de *melting* de fragmentos idênticos lado a lado em géis de gradiente desnaturante, torna possível detetar fragmentos com mutações nas cadeias desnaturadas.

As *pools* foram carregados num gel de poliacrilamida com um gradiente desnaturante 40-80% Ureia/Formamida (U/F), obtido a partir das soluções de 9% poliacrilamida (PAA), 80% U/F, 20% de persulfato de amónio (APS) e tetrametiletilenediamina (TEMED) (em Anexos - II). A ordem de pipetagem no gel consistiu em carregar em poços consecutivos a *pool* A de todos os casos, a seguir a *pool* B de todos os casos e assim, sucessivamente até esgotar as *pools*, de modo a permitir a comparação lado a lado do padrão de migração eletroforético dos mesmos fragmentos em diferentes casos.

A eletroforese foi realizada durante 18 horas, a 120 volts, em tanques com 0,5×TAE (pH=8,0), a uma temperatura de 61,5°C. Após a eletroforese, o gel foi submerso numa tina com brometo de etídio durante 20 minutos e visualizado com UV's num transiluminador.

A presença de um padrão de bandas aberrantes num ou mais fragmentos ou de diferenças na migração eletroforética, foi confirmado por sequenciação do ou dos fragmentos em causa, de modo a obter a identificação da mutação causadora do padrão eletroforético anormal (exemplo em Anexos – III).

## 2.12. Interpretação das mutações

De modo a classificar e catalogar as mutações encontradas, todas foram pesquisadas no site da *International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours* (<http://www.insight-group.org/mutations/>) e/ou no site da *The Human Gene Mutation Database* ([www.hgmd.cf.ac.uk/](http://www.hgmd.cf.ac.uk/)) ou noutra literatura associada e submetidas a testes computacionais disponíveis online, nomeadamente: o *Splice-Site Prediction Test* ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/splice.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html)) para possíveis

mutações *splice-site*, que permite prever alterações nos locais de *splicing* ou o *Polyphen* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) para mutações *missense*, que permite prever o possível impacto da substituição de um aminoácido na estrutura e função de uma proteína humana.

### **2.13. *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification***

Para a detecção/exclusão de grandes deleções/duplicações no gene MYH foi usado o SALSA MLPA probemix P378-A2 MUTYH (MRC-Holland), de acordo com as recomendações/instruções fornecidas pelo kit.

# **RESULTADOS**

Das 115 amostras estudadas, 29 (25,2%) apresentaram mutações nas regiões relevantes do gene MYH (exões e transições exão-intrão) – tabela 1. Destes, 8 (27,6%) casos apresentavam uma mutação em heterozigotia, 7 casos (24,1%) apresentavam uma mutação em homozigotia e 14 casos (48,3%) apresentavam duas mutações em heterozigotia (heterozigotia composta). A média de idades dos casos positivos é de 57,4 anos e são referentes a 16 homens e 13 mulheres.

Das mutações detetadas 62% (31/50) são *missense*, 8% (4/50) são mutações *splice-site*, 14% (7/50) são *frameshift*, 6% são intrónicas (3/50), 2% (1/50) são silenciosas e 8% (4/50) são grandes deleções.

Nas restantes 86 amostras não foram detetadas mutações patogénicas ou potencialmente patogénicas, ainda que tenham sido identificados casos com polimorfismos conhecidos deste gene (dados não apresentados).

Tabela 1 – Casos em que foi detetada pelo menos uma mutação.

Caso	Género	Idade (anos)	Mutações encontradas		Tipo
			Descrição	Hetero/homozigotia	
2	Masculino	54	c.389-1G>C	Heterozigotia	<i>Splice-site</i>
3	Masculino	44	c.536A>G	Homozigotia	<i>Missense</i>
5	Feminino	39	c.1430C>T	Heterozigotia	<i>Missense</i>
14	Feminino	58	c.325C>T c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
15	Feminino	46	c.349-?(1650?)del	Homozigotia	Deleção
18	Masculino	52	c.536A>G c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
20	Masculino	63	c.536A>G c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
25	Feminino	46	c.1228G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
30	Feminino	75	c.1187G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
37	Feminino	68	c.536A>G	Homozigotia	<i>Missense</i>
38	Masculino	64	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
42	Feminino	71	c.1227_1228dupGG	Homozigotia	<i>Frameshift</i>
43	Masculino	67	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
47	Masculino	41	c.536A>G c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
50	Feminino	56	c.536A>G c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
56	Masculino	54	c.389-1G>C c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
61	Masculino	57	c.1187G>A c.349-?(1650?)del	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> Deleção
69	Feminino	66	c.389-1G>C c.851A>G	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
73	Feminino	41	c.1227_1228dupGG c.349-?(1650?)del	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Frameshift</i> Deleção
76	Masculino	51	c.1187G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
86	Masculino	53	c.1187G>A c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
87	Masculino	69	c.1187-27C>T	Heterozigotia	Intrónica
88	Masculino	79	c.1337_1339delTCT	Heterozigotia	<i>In frame</i>
93	Masculino	54	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
94	Feminino	46	c.536A>G c.388+56G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> Intrónica
95	Masculino	66	c.536A>G	Heterozigotia	<i>Missense</i>
106	Feminino	55	c.389-1G>C c.536A>G	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
111	Feminino	57	c.734G>A c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
115	Masculino	73	c.36+11C>T c.1431G>C	Heterozigotia Heterozigotia	Intrónica Silenciosa

No total, foram encontradas 15 mutações diferentes. As diferentes mutações e a distribuição de frequência de cada uma delas encontra-se descrita no gráfico 3.

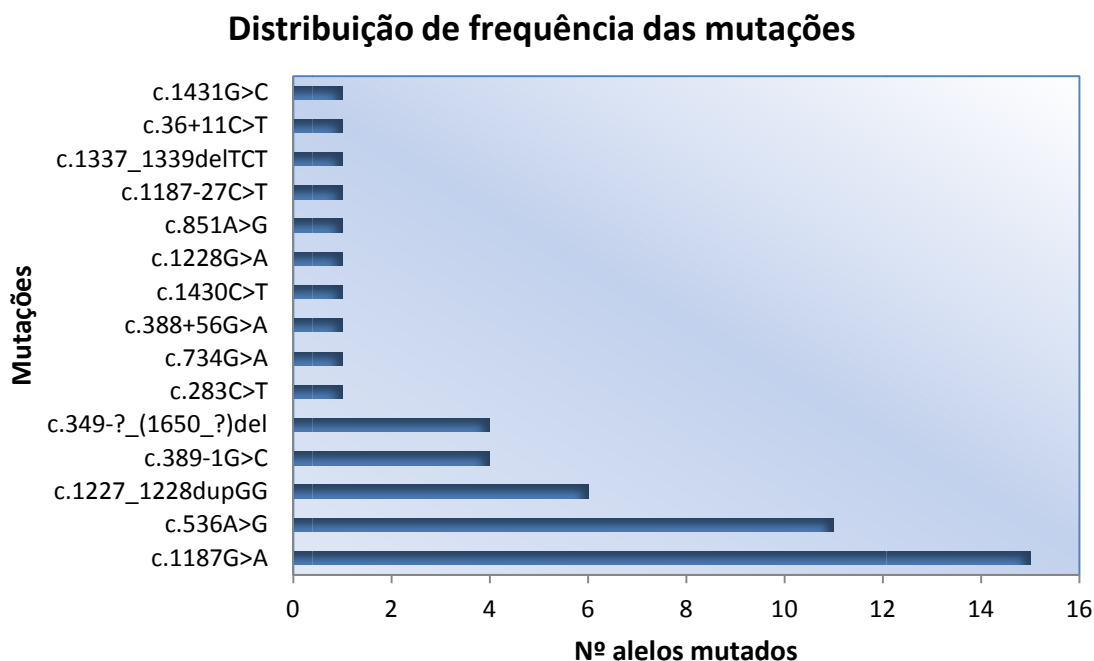


Gráfico 3 – Distribuição de frequência das mutações detetadas.

Em 22 dos 29 casos com mutações (75,9%) foram detetadas mutações comprovadamente patogénicas, de acordo com a literatura consultada, distribuídas como descrito na tabela 2. Em 3 destes 22 casos (13,6%) a mutação patogénica encontrada apresentava-se em heterozigotia (um alelo normal, um alelo mutado), em 7 casos (31,8%) em homozigotia e em 12 casos (54,1%) foi observada heterozigotia composta (dois alelos mutados, mas com mutações diferentes), dos quais 5 casos referem-se a mutação patogénica + variante não classificada.

As mutações *missense* c.536A>G e c.1187G>A representam 30,6% (11/36) e 41,7% (15/36) respetivamente, dos alelos com mutações patogénicas. A mutação *frameshift* c.1227\_1228dupGG foi responsável por 16,7% (6/36) destes

alelos e a deleção c.349-?(1650\_?)del foi detetada em 11,1% (4/36) dos alelos com mutações patogénicas (Anexos – IV e V).

Tabela 2 – Casos com mutações comprovadamente patogénicas.

Caso	Género	Idade (anos)	Mutações encontradas		Tipo
			Descrição	Hetero/homozigotia	
3	Masculino	44	c.536A>G	Homozigotia	<i>Missense</i>
14	Feminino	58	c.325C>T (*) c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
15	Feminino	46	c.349-?(1650_?)del	Homozigotia	Deleção
18	Masculino	52	c.536A>G c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
20	Masculino	63	c.536A>G c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
30	Feminino	75	c.1187G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
37	Feminino	68	c.536A>G	Homozigotia	<i>Missense</i>
38	Masculino	64	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
42	Feminino	71	c.1227_1228dupGG	Homozigotia	<i>Frameshift</i>
43	Masculino	67	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
47	Masculino	41	c.536A>G c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
50	Feminino	56	c.536A>G c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
56	Masculino	54	c.389-1G>C (*) c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
61	Masculino	57	c.1187G>A c.349-?(1650_?)del	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> Deleção
73	Feminino	41	c.1227_1228dupGG c.349-?(1650_?)del	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Frameshift</i> Deleção
76	Masculino	51	c.1187G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
86	Masculino	53	c.1187G>A c.1227_1228dupGG	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Frameshift</i>
93	Masculino	54	c.1187G>A	Homozigotia	<i>Missense</i>
94	Feminino	46	c.536A>G c.388+56G>A (*)	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> Intrónica
95	Masculino	66	c.536A>G	Heterozigotia	<i>Missense</i>
106	Feminino	55	c.389-1G>C (*) c.536A>G	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
111	Feminino	57	c.734G>A (*) c.1187G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>

(\*) Mutações incluídas na tabela apesar de não serem classificadas como “comprovadamente patogénicas”, dado terem sido detetadas juntamente com mutações comprovadamente patogénicas. Por esta razão, os casos com estas mutações foram também incluídos na tabela 3.

Nos restantes 7 casos (24,1%) com mutações não comprovadamente patogénicas foram detetadas 11 variantes distintas, que se encontram descritas na tabela 3. Todas foram detetadas em heterozigotia, ou heterozigotia composta com outra variante.

Tabela 3 – Casos com outras variantes (não comprovadamente patogénicas).

Caso	Género	Idade (anos)	Mutações encontradas		Tipo
			Descrição	Hetero/homozigotia	
2	Masculino	54	c.389-1G>C	Heterozigotia	<i>Splice-site</i>
5	Feminino	39	c.1430C>T	Heterozigotia	<i>Missense</i>
14	Feminino	58	c.325C>T c.1187G>A (*)	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
25	Feminino	46	c.1228G>A	Heterozigotia	<i>Missense</i>
56	Masculino	54	c.389-1G>C c.1187G>A (*)	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
69	Feminino	66	c.389-1G>C c.851A>G	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
87	Masculino	69	c.1187-27C>T	Heterozigotia	Intrónica
88	Masculino	79	c.1337_1339delTCT	Heterozigotia	<i>In frame</i>
94	Feminino	46	c.536A>G (*) c.388+56G>A	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> Intrónica
106	Feminino	55	c.389-1G>C c.536A>G (*)	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Splice-site</i> <i>Missense</i>
111	Feminino	57	c.734G>A c.1187G>A (*)	Heterozigotia Heterozigotia	<i>Missense</i> <i>Missense</i>
115	Masculino	73	c.36+11C>T c.1431G>C	Heterozigotia Heterozigotia	Intrónica Silenciosa

(\*) Mutações comprovadamente patogénicas incluídas por terem sido encontradas em heterozigotia composta com outra variante. Por esta razão, os casos com estas mutações foram também incluídos na tabela 2.

A previsão do significado clínico destas mutações, de acordo com a literatura e programas computacionais adequados constam na tabela 4.



Tabela 4 – Previsão do significado clínico de cada uma das variantes encontradas.

<b>Mutação</b>	<b>Significado clínico previsto</b>
c.1431G>C p.(Thr477Thr)	1. Desconhecido 3. Não altera o <i>splicing</i>
c.36+11C>T	1. Desconhecido 3. Não altera o <i>splicing</i>
c.1337_1339delTCT	1. Não descrita 3. Não altera o <i>splicing</i>
c.1187-27C>T	1. Desconhecido 3. Não altera o <i>splicing</i>
c.851A>G p.(Glu284Gly)	1. Não descrita 2. Provavelmente patogénica
c.1228G>A p.(Glu410Lys)	1. Não descrita 2. Provavelmente benigna
c.1430C>T p.(Thr477Met)	1. Desconhecido 2. Provavelmente patogénica
c.388+56G>A	1. Desconhecido 3. Não altera o <i>splicing</i>
c.734G>A p.(Arg245His)	1. Provavelmente patogénica 2. Provavelmente patogénica
c.325C>T p.(Arg109Trp)	1. Desconhecido 2. Provavelmente patogénica
c.389-1G>C	1. Provavelmente patogénica 3. Possível <i>skipping</i> do exão 5

1. Classificação obtida na InSIGHT (*International Society for Gastrointestinal Hereditary Tumours*)
2. Resultado do *Polyphen-2*
3. Resultado do *Splice Site Prediction Test*

# **DISCUSSÃO**

A polipose cólica associada ao MYH (MAP) é uma síndrome hereditária com transmissão autossômica recessiva, sendo causada por mutações bialélicas no gene MYH (Bolocan *et al*, 2011). A MAP é responsável por cerca de 0,5 - 1% dos carcinomas colorretais e por 10-30% dos casos de polipose cólica (Claes *et al*, 2011).

Embora a expressão da MAP seja variável, o número de pólipos adenomatosos do cólon é habitualmente inferior ao verificado na forma clássica Polipose Adenomatosa Familiar do Cólon (FAP), associada a mutações do gene APC (Shinmura *et al*, Sampson *et al*, 2009), o que explica provavelmente o facto de a idade média ao diagnóstico de MAP ser superior à verificada na FAP (45-50 anos versus 30 anos) (Filipe *et al*, 2009).

A identificação de portadores de mutações patogénicas em homozigotia ou heterozigotia composta do gene MYH é de grande importância clínica, já que, para além de confirmar o diagnóstico de MAP, permite a adoção de medidas adequadas de rastreio e diagnóstico precoce de CCR (sobretudo colonoscopias periódicas) e/ou de cirurgia de redução de risco (colectomia total ou parcial).

Por outro lado, a documentação de homozigotia (ou heterozigotia composta) para mutações patogénicas do gene MYH num indivíduo, alertará para a existência de uma probabilidade de 25% de outros membros da fratria terem um genótipo idêntico.

Quanto às implicações clínicas da presença de uma mutação patogénica do gene MYH em heterozigotia, não existe consenso. De facto, ainda que o risco de desenvolver CCR dos portadores monoalélicos de mutações patogénicas do gene MYH não tenha sido ainda comprovado, há artigos que admitem haver um aumento ligeiro do risco, tornando-se assim importante a sua deteção e identificação (Shinmura *et al*, 2012).

Por último, é de sublinhar que a presença de uma mutação patogénica (em hetero ou homozigotia) num indivíduo poderá condicionar um risco elevado de MAP na descendência, caso o cônjuge seja igualmente portador de uma alteração génica relevante no mesmo gene.

De acordo com os dados da literatura, estão descritas mutações no gene MYH ao longo de toda a sua sequência codificante, algumas das quais com uma

incidência particularmente elevada em doentes com MAP de determinadas populações (Poulsen & Bisgaard, 2008).

Na população caucasiana, existe consenso quanto ao facto de as mutações *missense* c.536A>G (p.Tyr179Cys) e c.1187G>A (p.Gly396Asp) serem as mais frequentes e representarem cerca de 80% de todos os alelos mutados reportados (Sieber, 2003). Por esse facto, os exões 7 e 13, onde se localizam estas mutações, são considerados os *hotspots* do gene na população caucasiana (Torrezan, 2011).

No presente trabalho, o gene MYH foi estudado numa série consecutiva de 115 amostras enviadas para o GDPN, referentes a doentes com polipose cólica e suspeita de MAP.

Para este estudo, foi seguida a metodologia que é usada por rotina no nosso laboratório (GDPN) e que consiste em rastrear todo o gene MYH na procura de mutações pontuais potencialmente relevantes em termos clínicos. Dessa rotina laboratorial faz parte o uso da técnica DGGE, que tem como principais vantagens ser de baixo custo e, quando conjugada com a análise de heteroduplexes, ter uma sensibilidade e especificidade próximas dos 100% (van der Hout, 2006), tendo como principal desvantagem ser um método moroso e laborioso. A sequenciação direta é aplicada numa pequena porção do exão 14 (por ser de difícil visualização no gel de DGGE) e sempre que encontrado um padrão eletroforético anormal no DGGE.

Os resultados obtidos nesta série confirmam, por um lado, que as alterações de sequência do gene MYH ocorrem ao longo do gene (intrão 1, exão 3, intrão 4, exão 7, exão 9, exão 10, intrão 12 até aos exões 13-15) e, por outro lado, o predomínio das mutações *missense* c.536A>G (p.Tyr179Cys) e c.1187G>A (p.Gly396Asp).

Com efeito, estas duas mutações foram responsáveis por 72,2% dos alelos mutados detetados. Em 7 casos (31,8%) estas mutações encontravam-se em homozigotia ou heterozigotia composta.

A 3ª mutação mais frequente foi a c.1227\_1228dupGG, descrita num estudo deste gene na população portuguesa com uma frequência semelhante (19%) à encontrada na presente série (16,7%) (Isidro, 2004).

Em 3 casos (casos 2, 5 e 88 - tabela 3) foi detetada uma variante “provavelmente patogénica”, em heterozigotia.

De registar ainda que, em 7 casos (casos 14, 56, 69, 94, 106, 111 e 115 da tabela 3), foi detetada heterozigotia composta (5 casos com uma mutação patogénica e uma mutação “provavelmente patogénica” e 2 casos com 2 variantes “provavelmente patogénicas”).

Face aos resultados obtidos com esta metodologia, importa responder à questão de saber qual a melhor estratégia para o estudo do gene MYH em doentes com suspeita de MAP.

Neste estudo, tal como na literatura relacionada, o predomínio das mutações *missense* c.536A>G (exão 7) e c.1187G>A (exão 13) em alelos mutados é notório. Assim, a conclusão mais óbvia seria a de pesquisar unicamente estas mutações. De facto, caso se tivesse aplicado essa metodologia, das 15 mutações encontradas (4 das quais comprovadamente patogénicas), ter-se-iam detetado todas as mutações pontuais comprovadamente patogénicas, para além das variantes seguintes, de significado desconhecido mas classificadas pelo programa *Polyphen* como provavelmente benignas: c.1127-27C>T e c.1228G>A.

No entanto, a grande deleção c.349-?(1650\_?)del (casos 15, 61 e 73 da tabela 2), não seria detetada pela análise dirigida aos *hotspots* do gene, através de DGGE ou sequenciação.

Na verdade, a deleção referida do caso 15, em homozigotia, foi suspeitada pelo facto de não ter sido obtido produto de amplificação dos exões 4 a 16 e foi confirmada pelo PCR *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA), já os casos 61 e 73 foram inicialmente classificados como homozigóticos para as mutações c.1187G>A e c.1227\_1228dupGG, respetivamente. Com efeito, por sequenciação não é possível distinguir os casos homozigóticos para uma mutação, dos casos que têm mutação num alelo e deleção extensa no outro. Só a ausência de mutação num dos filhos do caso 61 fez suspeitar que no caso índice se verificasse hemizigotia para a mutação pontual, e não homozigotia, o que veio

a confirmar-se pela técnica de MLPA e levou ao estudo subsequente de todos os homozigóticos e heterozigóticos.

Quanto às mutações pontuais, se tivéssemos adotado o estudo do gene MYH dirigido apenas aos *hotspots* referidos, a grande maioria (9 em 11) das variantes de significado desconhecido (tabela 3) ficaria também por detetar.

Assim, importa analisar que informação se perderia com essa estratégia.

Ao analisar a tabela 4, verifica-se que cerca de 45% das variantes de significado desconhecido são provavelmente patogénicas, de acordo com o programa computacional utilizado para prever o significado clínico das alterações encontradas. É certo que este tipo de programas não têm uma sensibilidade e especificidade de 100%, mas, na falta de estudos funcionais que avaliem o efeito das mutações na função da proteína, parece prudente considerar como deletérias as alterações classificadas pelos mesmos como “provavelmente patogénicas”.

Nenhuma das mutações classificadas como “provavelmente patogénicas” detetadas no nosso estudo nos 10 casos acima referidos (casos 2, 5, 14, 56, 69, 88, 94, 106, 111 e 115 da tabela 3) teria sido detectada por um estudo dirigido exclusivamente aos *hotspots* do gene MYH (exões 7 e 13). De referir que se verificou heterozigotia composta em 7 casos, seja mutação patogénica e mutação “provavelmente patogénica” (casos 14, 56, 94, 106 e 111), seja a presença de duas mutações “provavelmente patogénicas” (caso 69 e 115) e heterozigotia simples nos restantes 3 casos (casos 2, 5, 88).

Assim, se admitirmos como correta a classificação das mutações pelo programa *Polyhen*, ao usar uma metodologia que apenas pesquisasse os *hotspots* do gene, nestes casos não teriam sido detetadas as variantes provavelmente patogénicas e os doentes teriam sido classificados como portadores monoalélicos ou, até, sem alterações (casos 69 e 115).

Ora, para além das implicações clínicas para os doentes decorrentes da não identificação destas mutações, a vigilância dos descendentes também poderia ser comprometida. De facto, dada a prevalência das mutações patogénicas c.536A>G e c.1187G>A em controlos saudáveis na população portuguesa de 1% e 1,5%, respetivamente (Isidro *et al*, 2004), poderá justificar-se

a pesquisa das mesmas (ou, porventura, o estudo completo do gene MYH) nos cônjuges de portadores de variantes patogénicas ou provavelmente patogénicas, no sentido de orientar o estudo futuro dos filhos.

Apenas em 2 casos (casos 25 e 87 da tabela 3), as mutações detetadas eram provavelmente clinicamente irrelevantes, de acordo com o programa *Polyphen*.

No entanto, as duas mutações detetadas no caso 115 (de ascendência chinesa), ainda que individualmente não aparentem ser patogénicas, já foram relatadas num estudo na população japonesa, onde foi admitida a possibilidade de a presença conjunta destas duas variantes poder conferir um aumento da susceptibilidade para CCR (Tao *et al*, 2008).

Pelo exposto anteriormente, ao utilizar uma metodologia focada somente no estudo dos *hotspots* do gene MYH, tal levaria à não identificação de potenciais mutações patogénicas e à classificação errada do genótipo em 44,8% (13/29) dos casos com alterações deste gene.

Os nossos resultados apontam, portanto, para a necessidade de serem estudadas todas as regiões codificantes do gene MYH nos indivíduos sem alterações ou com uma mutação num dos *hotspots* deste gene.

Acresce que deverá ser considerada a possibilidade de grandes deleções no gene MYH em doentes com MAP, tal como foi observado nos três casos acima referidos (15, 61 e 73). Apesar de termos conhecimento de apenas dois relatos desta deleção na literatura, num deles em heterozigotia composta com a mutação p.Gly396Asp (Torrezan, 2011; Rouleau, 2011), parece prudente introduzir esta técnica na rotina laboratorial. Assim, pacientes portadores de mutação em aparente homozigotia ou heterozigotia devem ser sujeitos a uma análise adicional por MLPA (ou técnica equivalente) que permita a deteção de grandes deleções/duplicações (Rouleau, 2011).

# **CONCLUSÃO**



Com este estudo concluiu-se que as mutações p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp são responsáveis por mais de 70% dos alelos MYH mutados, o que está de acordo com os dados da literatura. As restantes variantes encontradas carecem de estudos funcionais para serem inequivocamente classificadas como patogénicas ou clinicamente irrelevantes.

Concluiu-se igualmente que a melhor estratégia para o rastreio do gene MYH neste laboratório, deverá passar pelo estudo inicial dos exões 7 e 13 do gene, seguindo-se um estudo de toda a sequência codificante do gene em todos os casos negativos ou heterozigóticos para uma mutação patogénica. Por outro lado, nos pacientes portadores de mutação em aparente homozigotia ou heterozigotia deverá ser considerada a hipótese de uma análise adicional por MLPA no sentido de detetar/excluir a presença de grandes deleções/duplicações.

Sublinhe-se, por último, a necessidade de os protocolos a adotar para o estudo do gene MYH deverem ter em conta as populações a estudar, dadas as diferenças de prevalência das mutações encontradas em diferentes populações. Por exemplo, as mutações p.Tyr179Cys e p.Gly396Asp, responsáveis por mais de 70% das alterações patogénicas encontradas na nossa série, são mutações raras na população japonesa.

Dado o espectro de mutações encontradas ao longo do gene, muitas das quais de significado desconhecido, será importante o desenvolvimento de estudos funcionais robustos que permitam discriminar inequivocamente as mutações patogénicas das não patogénicas.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C-->T:A mutations in colorectal tumors. *Nat. Genet.* 2002;30:227-232.

Aceto G, Curia M, Veschi S, *et al.* Mutations of *APC* and *MYH* in unrelated Italian patients with adenomatous polyposis coli. *Hum. Mutat.* 2005;26:394.

Alhopuro P, Parker AR, Lehtonen R, Enholm S, *et al.* A novel functionally deficient MYH variant in individuals with colorectal adenomatous polyposis. *Hum. Mutat.* 2005;26:393-401.

Ames BN, Gold LS. Endogenous mutagens and the causes of aging and cancer. *Mutat Res.* 1991;250:3–16.

Bai H, Jones S, Guan X, Wilson TM, Sampson JR, Cheadle JP, Lu AL. Functional characterization of two human MutY homolog (hMYH) missense mutations (R227W and V232F) that lie within the putative hMSH6 binding domain and are associated with hMYH polyposis. *Nucleic Acids Res.* 2005;33:597-604.

Bolocan A, Ion D, Stoian RV, Serban MB. MAP Syndrome (MYH Associated Polyposis) colorectal cancer, etiopathological connections. *Journal of Medicine and Life.* 2011;4(1):109-111.

Brown G. Colorectal cancer. London: Cambridge University Press; 2007.

Claes K, Dahan K, Tejpar S, De Paepe A, Bonduelle M, Abramowicz M, Verellen C, Franchimont D, Van Cutsem E, Kartheuser A. The genetics of familial adenomatous polyposis (FAP) and MutYH-associated polyposis (MAP). *Acta Gastroenterol Belg.* 2011;74(3):421-6.

Cheadle JP, Sampson JR. Exposing the MYtH about base excision repair and human inherited disease. *Hum. Mol. Genet.* 2003;12(2):159-165.

Croitoru ME, Cleary SP, Di Nicola N, Manno M, Selander T, Aronson M, Redston M, Cotterchio M, Knight J, Gryfe R, Gallinger S. Association between biallelic and monoallelic germline MYH gene mutations and colorectal cancer risk. *J. Natl. Cancer Inst.* 2004;96:1631-1634.

Cummings JH and Bingham SA. Diet and the prevention of cancer. *BMJ.* 1998;317:1636–40.

Damjanov I. Pathology for the Health Related Professions. WB Saunders Company; 2000.

Dolwani S, Williams GT, West KP, Newman J, *et al.* Analysis of inherited MYH mutations in British Asian patients with colorectal cancer. *Gut.* 2007;56:593-600.

Eaden JA, Abrams KR, Mayberry JF. The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. *Gut.* 2001;48:526–35.

Filipe B, Baltazar C, Albuquerque C, Fragoso S, Lage P, Vitoriano I, Mão de Ferro S, Claro I, Rodrigues P, Fidalgo P, Chaves P, Cravo M, Nobre Leitão C. APC or MUTYH mutations account for the majority of clinically well-characterized families with FAP and AFAP phenotype and patients with more than 30 adenomas. *Clin Genet.* 2009;76(3):242-55.

Giovannucci E, Willett WC. Dietary factors and risk of colon cancer. *Ann Med.* 1994;26:443–52.

Gismondi V, Meta M, Bonelli L, *et al.* Prevalence of the Y165C, G382D and 1395delGGA germline mutations of the MYH gene in Italian patients with adenomatous polyposis coli and colorectal adenomas. *Int J Cancer.* 2004;109:680–4.

GLOBOCAN 2008 v2.0, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC Cancer Base No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Disponível a partir de: <http://globocan.iarc.fr>

Gu Y, Parker A, Wilson TM *et al.* Human MutY homolog, a DNA glycosylase involved in base excision repair, physically and functionally interacts with mismatch repair proteins human MutS homolog2/ human MutS homolog 6. *J Biol Chem.* 2002;277(13):11135-42.

Hoeijmakers JH. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature.* 2001;411:366–74.

Isidro G, Laranjeira F, Pires A, *et al.* Germline MUTYH (MYH) mutations in Portuguese individuals with multiple colorectal adenomas. *Hum Mutat.* 2004;24:353–4.

Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP. Biallelic germline mutations in MYH predispose to

multiple colorectal adenoma and somatic G:C-->T:A mutations. *Hum. Mol. Genet.* 2002;11:2961-2967.

Jones S, Lambert S, Williams GT, Best JM, Sampson JR, Cheadle JP. Increased frequency of the k-ras G12C mutation in MYH polyposis colorectal adenomas. *British Journal of Cancer.* 2004;90(8):1591-1593.

Kairupan C, Scott RJ. Base excision repair and the role of MUTYH. *Hereditary Cancer in Clinical Practice.* 2007;5(4):199-209.

Kastrinos F, Syngal S. Recently identified colon cancer predispositions: MYH and MSH6 mutations. *Semin Oncol.* 2007;34(5):418-424.

Karsten S, Stephan H, Katja K, Jörg W, Tilman V, Gabriela M, Christian P, Markus R, Anke RS, Wolff S. Feasibility and diagnostic utility of video capsule endoscopy for the detection of small bowel polyps in patients with hereditary polyposis syndromes capsule endoscopy in hereditary intestinal polyposis. *The American Journal of Gastroenterology.* 2005;100:27-37.

Kim H, Kim HJ, Chi SG. Absence of MutY homologue mutation in patients with multiple sporadic adenomatous polyps in Korea. *World J Gastroenterol.* 2006;12:951-955.

Kumar VKA, Gold JA, Mallon E, Thomas S, Hodgson SV. Sebaceous adenomas in an MYH associated polyposis patient of Indian (Gujarati) origin. *Familial Cancer.* 2008;7(2):187-189.

Lans H, Marteijn JA, Schumacher B, Hoeijmakers J, Jansen G, and Vermeulen W. Involvement of global genome repair, transcription coupled repair, and chromatin remodeling in UV DNA damage response changes during development. *PLoS Genet.* 2010;6(5): e1000941.

Leiden open variation database. <http://www.LOVD.nl/MUTYH>.

Leite JS, Isidro G, Martins M, Regateiro F, Albuquerque O, Amaro P, Romãozinho JM, Boavida G, Castro-Sousa F. Is prophylactic colectomy indicated in patients with MYH-associated polyposis? *Colorectal Dis.* 2005;7(4):327-31.

Linseisen J, Kesse E, Slimani N, *et al.* EPIC Working Group on Dietary Pattern, Subgroup Meat. Meat consumption in Europe: results from the EPIC study. *IARC Sci Publ.* 2002;156:211-12.

Michaels ML, Miller JH. The GO system protects organisms from the mutagenic effect of the spontaneous lesion 8-hydroxyguanine (7, 8-dihydro-8-oxoguanine). *J Bacteriol.* 1992;174:6321–5.

Miyaki M, Iijima T, Yamaguchi T, *et al.* Germline mutations of the MYH gene in Japanese patients with multiple colorectal adenomas. *Mutat Res.* 2005;578:430–3.

Moriya M, Grollman AP. Mutations in the mutY gene of *Escherichia coli* enhance the frequency of targeted G:C to T:A transversions induced by a single 8-oxoguanine residue in single-stranded DNA. *Mol Gen Genet.* 1993;239:72–6.

Nghiem Y, Cabrera M, Cupples CG, Miller JH. The mutY gene: A mutator locus in *Escherichia coli* that generates G:C to T:A transversions. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988;85:2709–13.

Niessen R, Sijmons R, Ou J *et al.* MUTYH and mismatch repair system: partners in crime? *Human Genetics.* 2006;119(1-2):206-11.

Nohmi T, Kim SR, Yamada M. Modulation of oxidative mutagenesis and carcinogenesis by polymorphic forms of human DNA repair enzymes. *Mutat. Res.* 2005;591:60-73.

Olschwang S, Blanché H, Moncuit C, Thomas G. Similar colorectal cancer risk in patients with monoallelic and biallelic mutations in the MYH gene identified in a population with adenomatous polyposis. *Genetic testing.* 2007;11(3):315-320.

Oka S, Nakabeppu Y. DNA glycosylase encoded by MUTYH functions as a molecular switch for programmed cell death under oxidative stress to suppress tumorigenesis. *Cancer Sci.* 2011;102:677–682.

Offit K, Ellis NA. Colorectal cancer risk in individuals with biallelic or monoallelic mutations of MYH. *Int. J. Cancer.* 2005;114:505-507.

Plotz G, Casper M, Raedle J, Hinrichsen I, Heckel V, Brieger A, Trojan J, Zeuzem S. MUTYH gene expression and alternative splicing in controls and polyposis patients. *Hum Mutat.* 2012;33(7):1067-74.

Poulsen MLM, Bisgaard ML MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Current Genomics.* 2008;9:420-435.

Rodriguez-Bigas M, Cutait R, Lynch P, *et al.* Hereditary colorectal cancer. Springer; 2010.

Roldan-Arjona T, Wei YF, Carter KC, Klungland A, Anselmino C, Wang RP, *et al.* Molecular cloning and functional expression of a human cDNA encoding the antimutator enzyme 8-hydroxyguanine-DNA glycosylase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94:8016–20.

Rouleau E, Zattara H, Lefol C, Noguchi T, Briaux A, *et al.* First large rearrangement in the MUTYH gene and attenuated familial adenomatous polyposis syndrome. *Clin Genet.* 2011;80:301-303.

Sakumi K, Furuichi M, Tsuzuki T, Kakuma T, Kawabata S, Maki H, *et al.* Cloning and expression of cDNA for a human enzyme that hydrolyzes 8-oxodGTP, a mutagenic substrate for DNA-synthesis. *J Biol Chem.* 1993;268:23524–30.

Sampson JR, Jones N. MUTYH-associated polyposis. *Best practice & research clinical gastroenterology.* 2009;23(2):209-18.

Sieber OM, Lipton L, Crabtree M, Heinemann K, Fidalgo P, Phillips RK, Bisgaard ML, Orntoft TF, Aaltonen LA, Hodgson SV, Thomas HJW, Tomlinson I. Multiple colorectal adenomas, classic adenomatous polyposis, and germ-line mutations in MYH. *N. Engl. J. Med.* 2003;348:791-799.

Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature.* 1991;349:431–4.

Shinmura K, Goto M, Tao H, Sugimura H. Role of Base Excision Repair Enzyme MUTYH in the Repair of 8-Hydroxyguanine and MUTYH Associated Polyposis (MAP). *Hereditary Genet.* 2012;1:111.

Slupska MM, Baikalov C, Luther WM, Chiang J-H, Wei Y-F, Miller JH. Cloning and sequencing a human homolog (hMYH) of the Escherichia coli mutY gene whose function is required for the repair of oxidative DNA damage. *J Bactiol.* 1996;178:3885–92.

Steinke V, Rahner N, Morak M, Keller G, Schackert HK, Görgens H, Schmiegel W, Royer-Pokora B, Dietmaier W, Kloor M, Engel C, Propping P, Aretz S; German HNPCC Consortium. No association between MUTYH and MSH6 germline mutations in 64 HNPCC patients. *Eur J Hum Genet.* 2008;16(5):587-92.

Tao H, Shinmura K, Suzuki M, Kono S, Mibu R, Tanaka M, *et al.* Association between genetic polymorphisms of the base excision repair gene MUTYH and increased colorectal cancer risk in a Japanese population. *Cancer Sci.* 2008;99(2):355-360.

Tenesa A, Campbell H, Barnetson R, Porteous M, Dunlop M, Farrington SM. Association of MUTYH and colorectal cancer. *Br. J. Cancer.* 2006;95:239-242.

Torrezan GT, da Silva FC, Krepischi AC, Santos ÉM, Ferreira F de O, *et al.* Breakpoint characterization of a novel large intragenic deletion of MUTYH detected in a MAP patient: case report. *BMC Med Genet.* 2011;12:128-133.

van der Hout AH, van den Ouweland AM, van der Luijt RB, Gille HJ, Bodmer D, Brüggerwirth H, Mulder IM, van der Vlies P, Elfferich P, Huisman MT, ten Berge AM, Kromosoeto J, Jansen RP, van Zon PH, Vriesman T, Arts N, Lange MB, Oosterwijk JC, Meijers-Heijboer H, Ausems MG, Hoogerbrugge N, Verhoef S, Halley DJ, Vos YJ, Hogervorst F, Ligtenberg M, Hofstra RM. A DGGE system for comprehensive mutation screening of BRCA1 and BRCA2: application in a Dutch cancer clinic setting. *Hum Mutat.* 2006;27(7):654-66.

Vasen HF, Möslein G, Alonso A, Aretz S, Bernstein I, *et al.* Guidelines for the clinical management of familial adenomatous polyposis (FAP). *Gut.* 2008;57:704-713.

Wei K, Kucherlapati R, Edelmann W. Mouse models for human DNA mismatch-repair gene defects. *Trends Mol Med.* 2002;8(7):346–53.



**ANEXOS**

I. Sequências dos *primers* utilizados para amplificação:

Exão		PRIMER 5' → 3'	SIZE (BP)	MELTING TEMP (°C)	ANNEALING TEMP(°C)
1	F	[60GC] CTTCCCCTCTCCCAGAGC	293	81.7	73.33
	R	[CGCCGC] GACGTCTGAACGGAAGTTTCG			
2	F	[40GC] CCCTTGGAAGGCCTCAAAT	294	75.9	66.5
	R	[CGCGCGCG] CCAGCCTGAATCTGCCTTTC			
3	F	[CGC] CTGTGTCCCAAGACCTGAT	299	76.5	68.55
	R	[40GC][ATATATAT] CACCCACTGTCCCTGCTC			
4	F	[40GC][ATATATAT] ACCATGGAGAAGACGGGTAG	299	77.4	68.55
	R	[CGCGC] GGTTGGCATGAGGACACTG			
5&6	F	GTAGGGGCAGGTCAGCAGT	394	75.1	71.9
	R	[40GC] TCACCCGTCAGTCCCTCTAT			
7	F	[CGCCCG] CGGGTGATCTCTTTGACCTC	248	75.8	68.55
	R	[40GC] CCCCTAGCTCCTCTACCAC			
8	F	[40GC] CCAGGAGTCTTGGGTGTCTT	280	77.8	68.55
	R	AGAGGGGCCAAAGAGTTAGC			
9	F	[CGCCC] CAGCCCAGGCTAACTCTTTG	233	78.0	68.55
	R	[40GC] AGCAGAGCTCCTTTGCAGAC			
10	F	[CGCGCGCGCG] GTGTCTGCAAAGGAGCTCTG	308	78.5	68.55
	R	[50GC] CATAGGGCAGAGTCACTCCTTAG			
11	F	[40GC] GGGCAGTGAGAAAGTCCTAAG	239	77.1	69.43
	R	[CGCCCG] AAGAACTGGAATGGGGCTTC			
12	F	[CGCCCG] CCTAAAGCCCTCTTGGCTTG	346	77.9	68.55
	R	[40GC] CCGATTCCCTCCATTCTCTC			
13	F	[CGCGCGC] AAGAGAGAATGGAGGGAATCG	292	79.4	65.52
	R	[60GC] TAGCCTCAAAGCCAACATC			
14a	F	[40GC] CACCTTGGGGAGGTAAGTGA	202	74.0	68.55
	R	[CGCGCGCGCG] AGGCCAGCCCATATACTTGA			
14b	F	[CGCGCGCG] CCAGGTTGTCCACACCTTCT	255	75.9	68.55
	R	[40GC] GAACATGTAGGAAACACAAGGAA			
15	F	[CGCCC] AAAAAGTGCCAGCCCTCAC	237	73.8	67.58
	R	[40GC] AGTGAAGCCTGGAGTGGAGA			
16	F	[CGCCC]CCCTCCCCCAACTACAAGG	266	75.0	71.9
	R	[40GC] TTTACTAACAACAGGATTCTCAGG			

40 GC-clamp: CGCCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCCCG

50 GC-clamp: CGCCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCGCGCCCCGGC

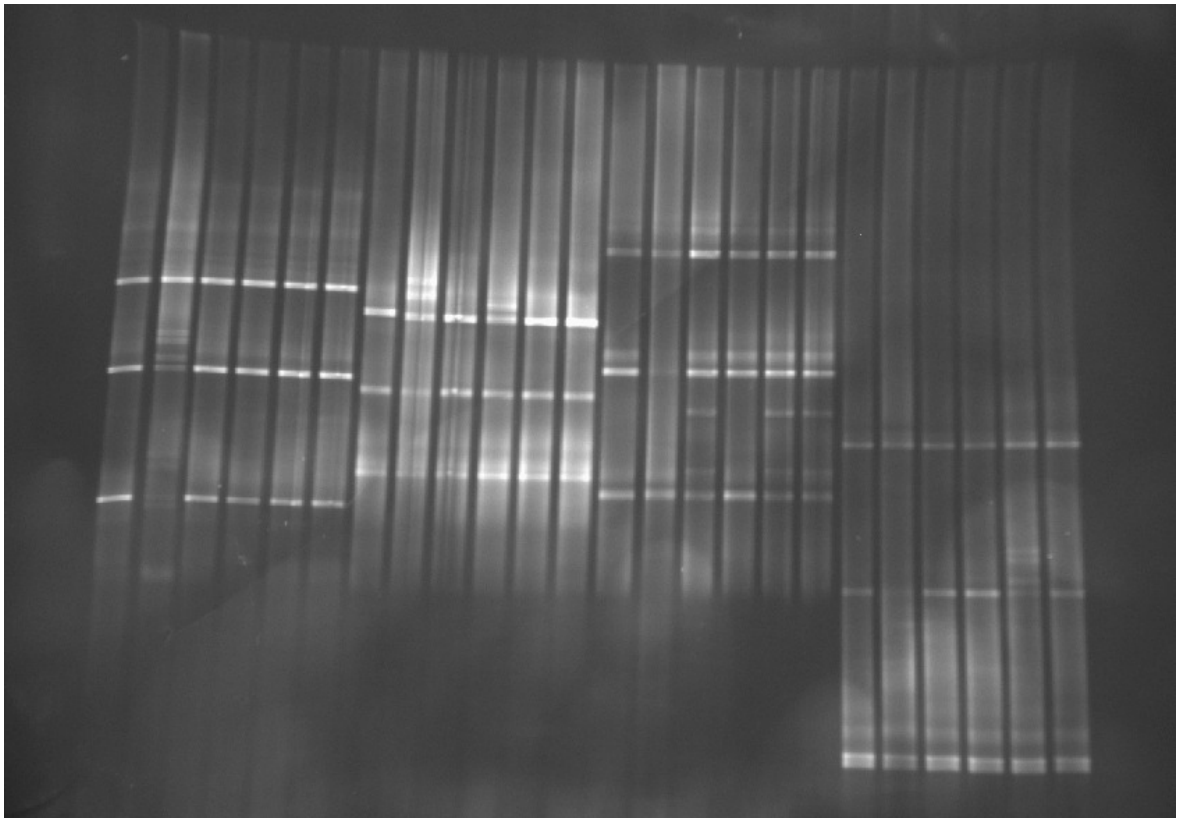
60 GC-clamp:

CGCCCGCGCGCCCCGCGCCCGGCCCGCCGCCCGCCCGCGCGCCCCGGCGCCCGCGCC

## II. Gel para DGGE de gradiente 40-80% U/F:

<u>%UF</u>	<u>80%UF</u>	<u>9%PAA</u>	<u>TEMED</u>	<u>APS 20%</u>
40	12,0 mL	12,0 mL	5,0 $\mu$ L	50 $\mu$ L
80	24,0 mL	-	5,0 $\mu$ L	50 $\mu$ L

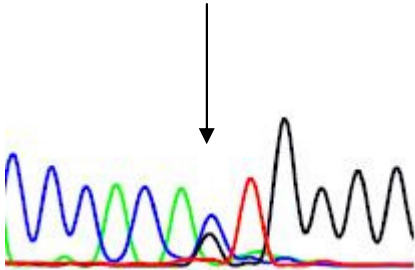
## III. Gel de DGGE visualizado sob UV's (exemplo):



Legenda: Da esquerda para a direita, *Pool* A, B, C, D e E.

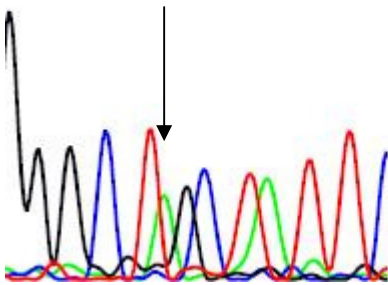
IV. Resultados de sequenciação (exemplos):

C C C A C A C T G G G C  
 280 2



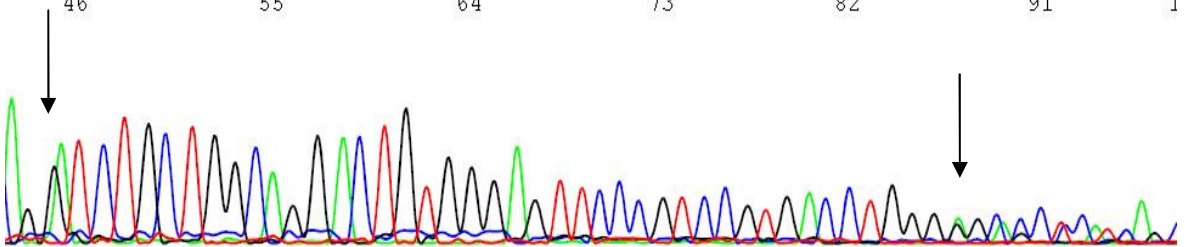
Mutação c.389-1G>C

G G G C T C C T A T T  
 46



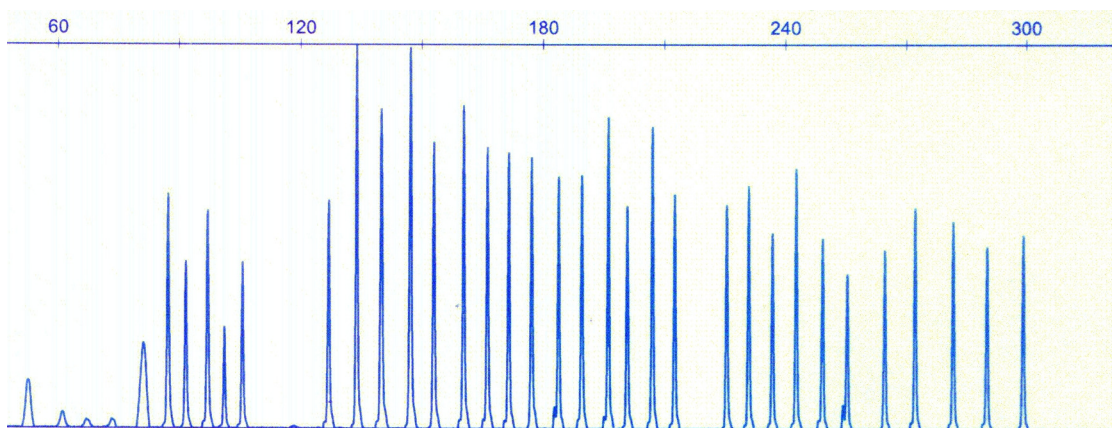
Mutação c.536A>G

A G (A T C T G C T G G C A G G A C T G T G G G A G T T C C C G T C C G T G A C C T G G G A G C C C T C T C A G  
 46 55 64 73 82 91 1

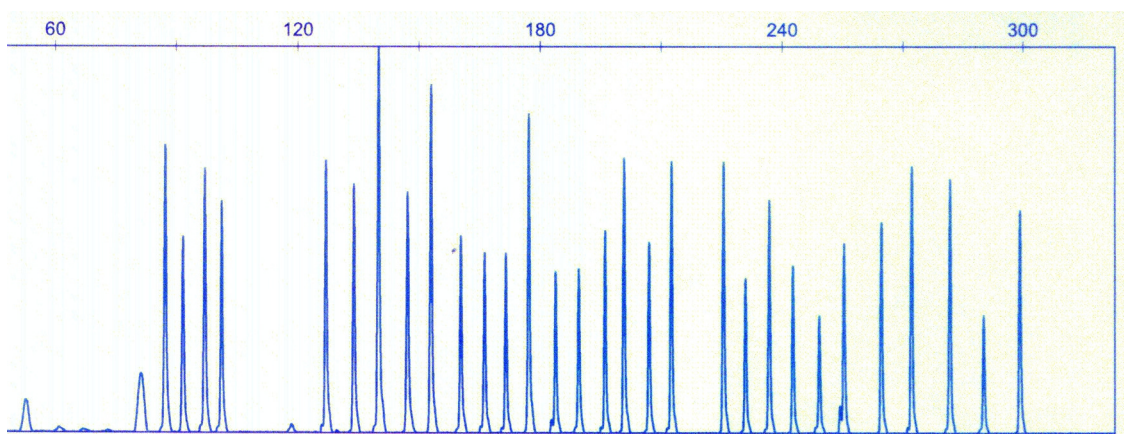


Mutações c.1187G>A e c.1227\_1228dupGG

## V. Resultados de MLPA (exemplos):



Caso normal



Caso com deleção dos exões 4 a 16.