



INSA, I.P.  
Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

## ***Cancro familiar - testes genéticos e estratégias***

Glória Isidro

Data: 08-10-2012

## Causa de morte- 2009 (1/100 000 habitantes)

O cancro é uma das principais causas de mortalidade em todos os Estados Membros da UE (com uma média de 169 óbitos por 100 000 habitantes)

	Total							Females	
	Cancer (2)	Lung cancer (3)	Colo-rectal cancer	Circulatory disease	Heart disease (4)	Respiratory disease	Transport accidents	Breast cancer	Uterus cancer
<b>EU-27</b>	169.0	38.6	18.9	217.3	79.8	43.6	7.4	23.1	7.2
Belgium	174.5	46.3	18.4	198.2	67.5	68.9	10.6	29.4	6.2
Bulgaria	161.2	36.3	21.8	605.0	116.1	39.7	11.0	21.3	13.5
Czech Republic	197.5	41.5	27.0	357.2	170.2	43.8	9.0	20.0	9.5
Denmark	188.9	48.2	23.8	159.5	59.8	66.5	5.5	28.9	5.7
Germany	159.8	34.3	18.1	217.1	84.4	39.5	5.0	24.0	5.5
Estonia	187.3	35.5	21.1	423.6	204.8	23.9	8.1	22.1	9.9
Ireland	180.8	39.9	20.1	190.1	102.3	70.6	5.9	28.1	8.0
Greece	153.5	40.1	12.4	244.6	67.4	53.7	13.6	21.1	5.3
Spain	153.0	36.1	20.0	143.2	45.4	50.3	5.7	17.6	5.8
France	166.0	36.6	16.7	124.7	33.8	27.3	6.9	24.1	6.4
Italy	161.2	35.2	17.4	173.8	60.3	28.6	8.3	23.5	5.1
Cyprus	123.1	25.0	10.0	194.4	70.7	39.4	10.5	21.5	4.2
Latvia	193.5	37.1	20.8	479.5	254.5	22.7	10.8	25.2	13.3
Lithuania	190.5	37.1	21.8	496.8	305.1	35.7	12.8	24.2	14.3
Luxembourg	165.8	40.6	19.4	186.2	44.8	44.3	9.1	24.5	4.5
Hungary	243.2	70.5	34.8	421.2	214.8	44.3	10.1	28.1	10.3
Malta	153.1	28.5	18.5	212.2	115.8	51.1	4.9	34.4	6.1
Netherlands	182.4	46.2	21.1	150.2	42.8	52.8	3.9	26.8	5.0
Austria	157.9	32.6	16.4	213.0	97.8	28.3	6.9	22.8	6.2
Poland	201.6	53.0	21.9	355.4	96.7	41.8	12.1	20.3	12.2
Portugal	156.2	26.5	22.0	177.6	42.2	63.7	9.0	20.2	8.4
Romania	181.4	42.3	19.5	548.4	188.8	50.6	15.1	22.6	17.4
Slovenia	198.5	39.0	26.5	231.7	64.4	37.8	9.3	25.5	8.4
Slovakia	197.0	37.6	28.8	450.0	270.1	51.7	9.2	21.3	12.4
Finland	134.8	25.9	13.2	218.1	122.5	24.4	6.0	19.4	5.6
Sweden	144.8	25.1	17.2	186.9	83.7	30.7	3.8	19.1	6.4
United Kingdom	172.6	40.3	17.0	169.2	80.8	69.6	4.0	25.4	5.9
Iceland	155.9	38.0	17.1	172.7	83.2	42.3	4.2	20.1	2.7
Norway	156.4	33.5	22.1	157.6	65.9	49.4	5.2	19.0	6.4
Switzerland	146.1	30.4	15.1	161.2	66.1	27.2	5.0	22.1	5.1
Croatia	211.8	49.4	28.5	387.6	158.4	33.2	12.9	25.4	9.6
FYR of Macedonia	173.8	42.5	18.8	566.4	89.7	33.4	7.2	23.7	10.5

(1) France and Italy, 2008; Switzerland, 2007; Belgium, 2005.

(2) Malignant neoplasms.

(3) Malignant neoplasm of larynx, trachea, bronchus and lung.

(4) Ischaemic heart diseases.

Source: Eurostat (online data code: h1th\_cd\_asdr)

**TABLE 1. Comparison of uptake rates (weighted averages) across genetic disorders for those with a family history of selected diseases**

Disease	uptake rate	average diagnosticity*	prevention†	severity‡
Huntington's Disease	14%	~100%	no	fatal
Cystic Fibrosis	30%	~100%	no	fatal
Hemochromatosis	36.3%	75%	no	severe but easily treated
Alzheimer's Disease	8.4%	35%	no	fatal
HPC	unknown	55%	no	75% 10-year survival§
→ HNPCC	58%	65%	no	75% 5-year survival§
→ FAP	unknown	80%	yes (surgery)	75% 5-year survival§
→ BRCA1/2-related breast cancer — in Ashkenazi Jewish women	38.5%	61% 85%	yes (surgery)	80% 5-year survival§

\* **diagnosticity:** the degree to which a positive genetic test means the disease will develop

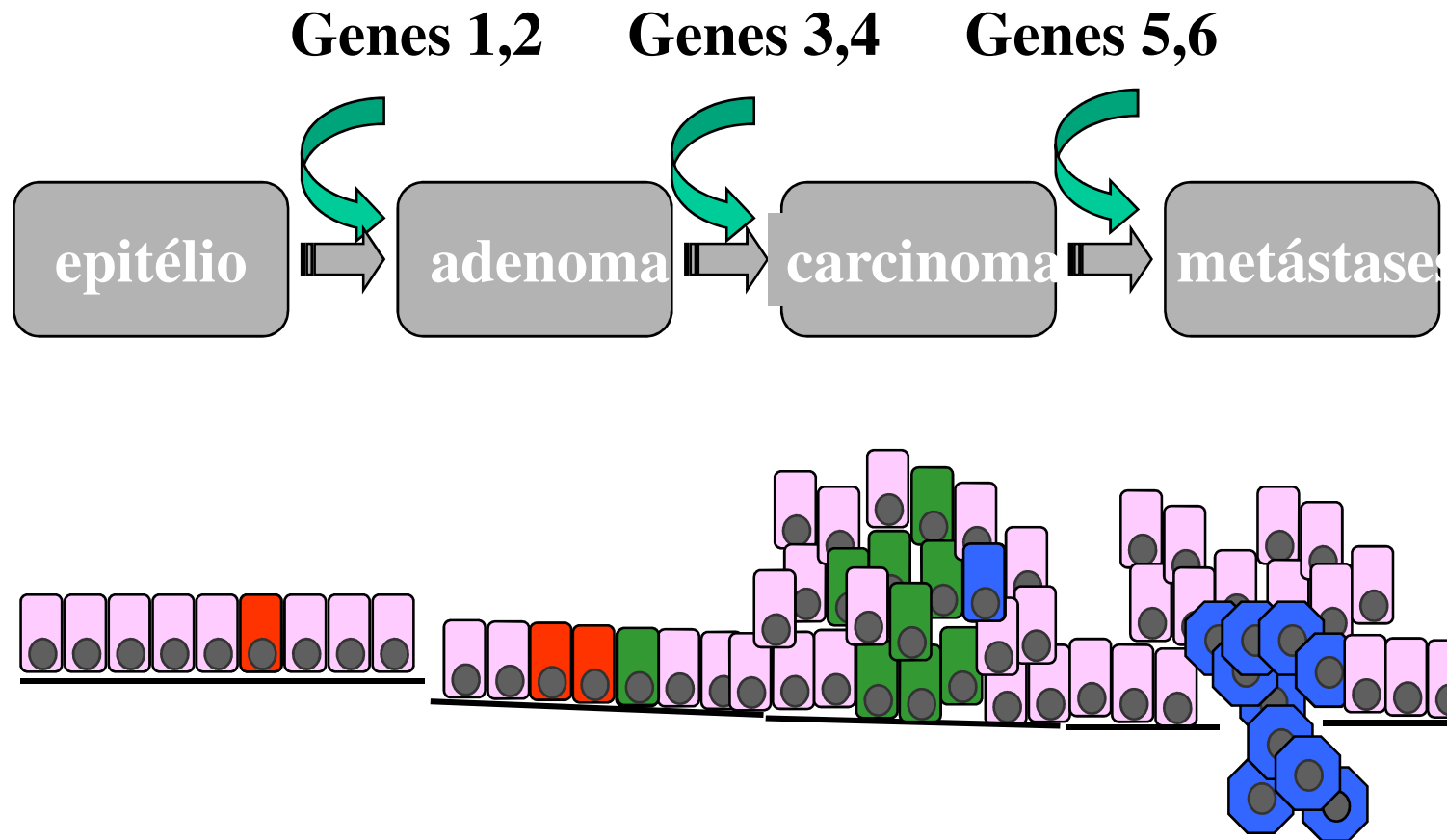
† **prevention:** the availability of treatments to prevent development of the disease

‡ **severity:** the "treatability" of the disease and resulting life expectancy if no preventive treatments are undertaken

§ Based on early-stage (Stage I or II) diagnosis\*\*

## O cancro é uma doença genética

O princípio da seleção clonal durante a tumorigénese



# Genes do Cancro

## Oncogenes

- Resultam da activação de **genes** que actuam na promoção do crescimento e divisão celular desregulada de uma forma dominante;
- Exercem o seu efeito para a malignidade mesmo quando **só um alelo é afectado**.

## Genes de reparação de erros do DNA

- Actuam de uma forma indirecta, promovendo mutações ao longo do genoma;
- Quando mutadas as células são **incapazes** de efectuar a **adequada reparação de danos** que ocorrem regularmente no DNA;
- Como exemplos temos os genes de *mismatch repair system* (**MMR**), e os do *base excision repair* (**BER**).

# Genes do Cancro

## Genes supressores de tumor ou oncosupressores

- São geralmente reguladores negativos do crescimento celular;
- Em geral **os dois alelos encontram-se inactivados em tumores**;
- Contribuem para o cancro de uma forma directa;
- São classificados em 3 grupos:

### **Gatekeeper genes**

Em muitos casos codificam para um sistema de verificações e equilíbrio que monitoriza a divisão e morte celular.

### **Caretaker genes**

Codificam produtos que estabilizam o genoma;

Mutações em genes do tipo caretaker levam à instabilidade genómica;

Células tumorais desenvolvem-se a partir de duas classes distintas de **instabilidade genómica** → **instabilidade mutacional** devida a alterações nucleótídicas do DNA e a **instabilidade cromossómica** devida a rearranjos cromossómicos inadequados;

### **Landscaper genes**

Codificam produtos que, quando mutados, contribuem para o crescimento neoplásico das células por favorecerem um ambiente de estroma que conduz a proliferação celular desregulada.

## RISCO DE CANCRO E GENES

**N-myc**  
**Ki-Ras**

**Neuroblastoma**  
**Colo-rectal**

**Oncogene**  
**Oncogene**

**MSH2**  
**MLH1**  
**MSH6**

**Colo-rectal**  
**Endométrio, outros**  
**Colo-rectal**

**Gene de reparação de erros do DNA**  
**Gene de reparação de erros do DNA**  
**Gene de reparação de erros do DNA**

**MYH**

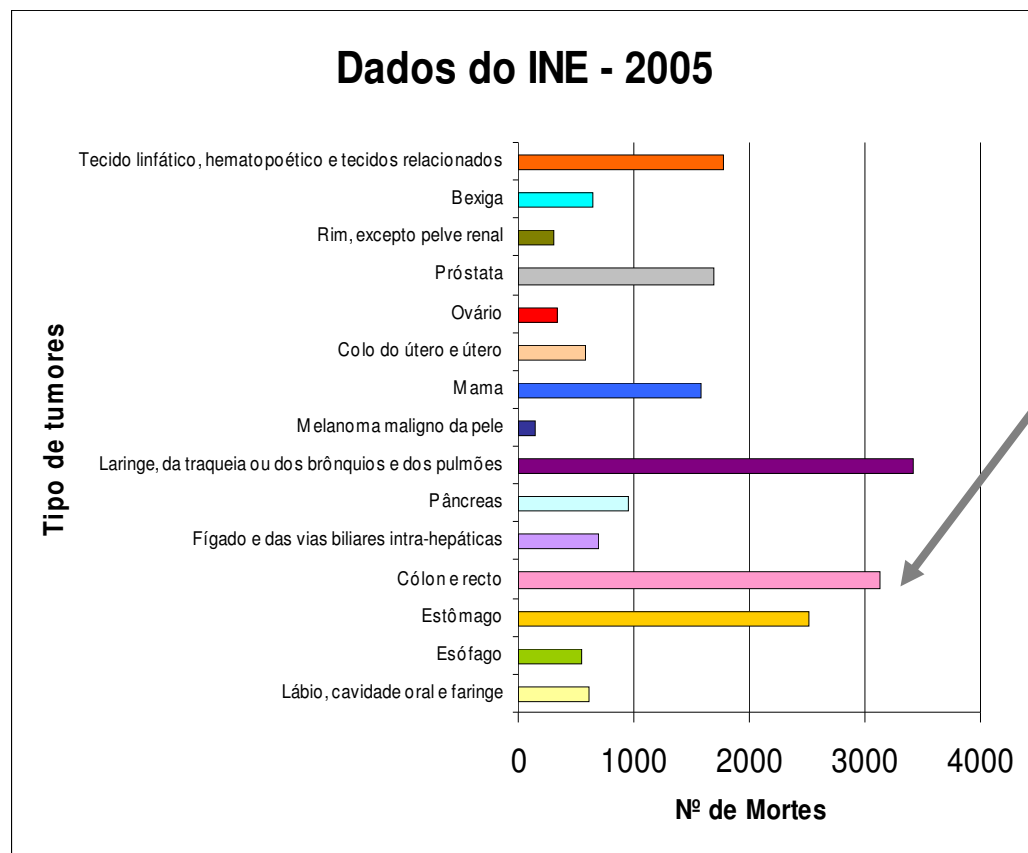
**Colo-rectal**

**Gene de reparação de erros do DNA**

**BRCA1**  
**BRCA2**  
**APC**

**Mama/Ovário**  
**Mama (dois sexos)**  
**Colo-rectal**

**Gene Supressor de tumor**  
**Gene Supressor de tumor**  
**Gene Supressor de tumor**



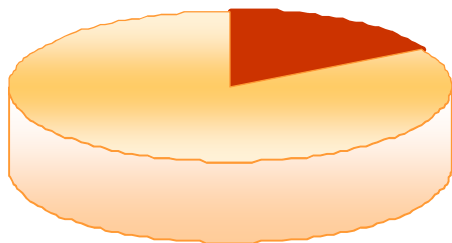
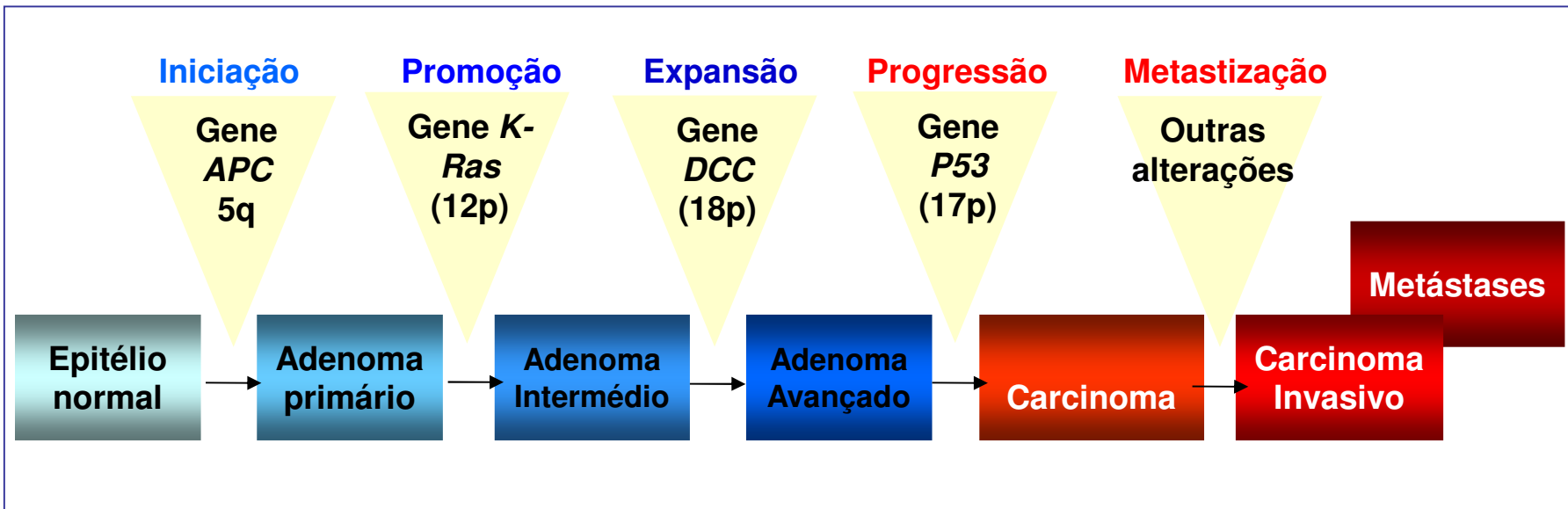
Cancro colorectal → 2ª causa de morte  
Taxa de sobrevivência ~40% após 5 anos



**São necessárias:  
Medidas de prevenção**





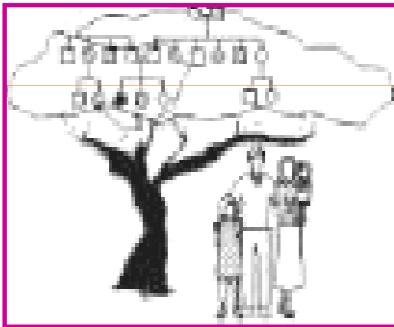


- Grande maioria são esporádicos ou seja sem incidência familiar
- 5-15% pertencem a famílias que apresentam uma predisposição para o desenvolvimento do cancro

## Mutações

Modificações na sequência de bases do DNA que determinam alterações no produto génico correspondente (proteína) e na sua função.

### 👉 Mutações Germinais



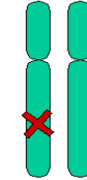
**Formas de cancro familiar:** são raros mas de expressão razoável em muitas formas de cancro. A mutação ocorre nos gametas (herdada dos pais) podendo por conseguinte ser transmitida à descendência e com ela a predisposição ao cancro. Uma vez que as mutações ocorrem na linha germinativa é possível fazerem-se testes preditivos em familiares de indivíduos afectados.

### 👉 Mutações Somáticas

**Formas de cancro esporádico:** são mais comuns mas não há risco para a família. A mutação ocorre numa célula somática.

# Cancro Colorectal Familiar

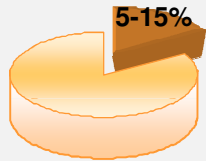
Mutação Dominante



Genótipo



Fenótipo

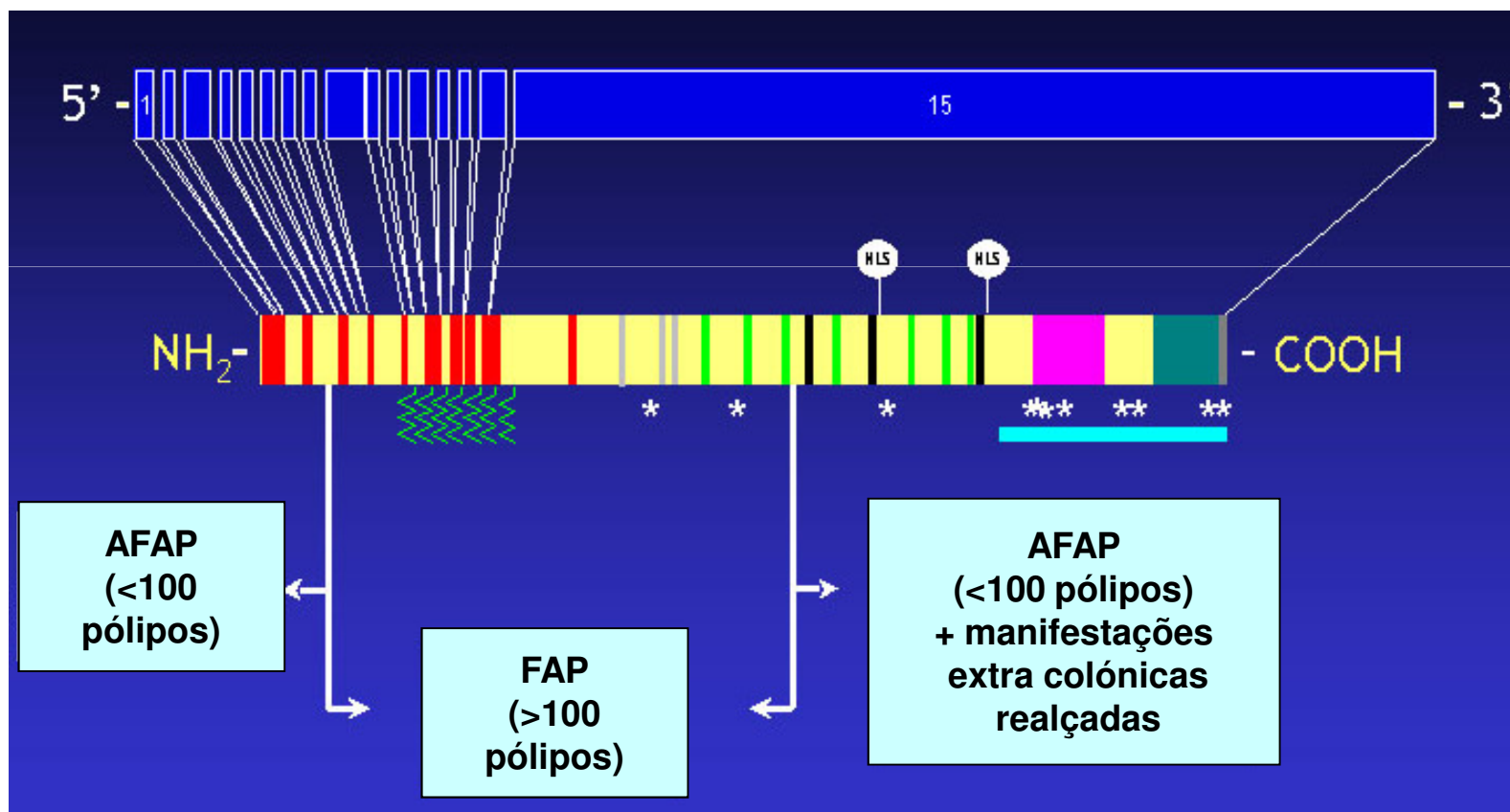


## 1. FAP (Polipose Adenomatosa Familiar)

- Doença autossómica dominante;
- C/ manifestações extracolónicas;
- 100 a >1000 pólipos adenomatosos;
- 70% das famílias apresentam mutações germinais no gene **APC**

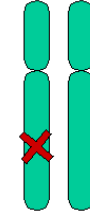
# Gene APC

Localiza-se no cromossoma 5 (5q21)  
Gene supressor de tumor  
RNA mensageiro com ~ 8,9 Kb



# Cancro Colorectal Familiar

Mutação  
Dominante



Genótipo



Fenótipo

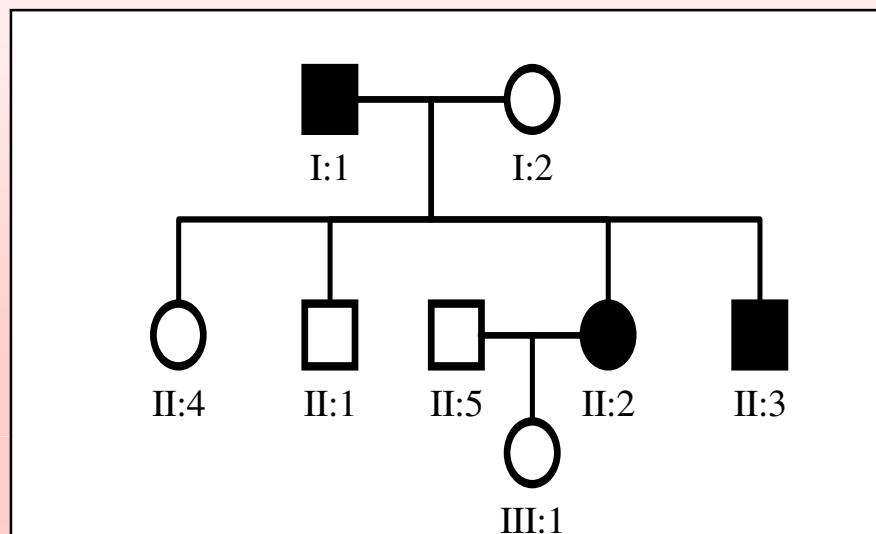
## 2. HNPCC

(Cancro Hereditário do Cólon e Recto sem Polipose ou Síndrome de *Lynch*)

- Doença autossómica dominante;
- Não apresenta pólipos;
- Síndrome de elevada susceptibilidade de cancro colorectal assim como outros órgãos;
- ~50% das famílias apresentam mutações germinais nos genes de reparação de DNA, em particular no *hMLH1* e no *hMSH2*;
- São importantes critérios para valorizarem a história familiar oncológica uma vez que não existem características clínicas antes do aparecimento do CCR.

**Assim:**

## Critérios de Amesterdão



- Três ou mais familiares com diagnóstico histológico de CCR, sendo pelo menos um familiar em 1º grau de outro.
- CCR envolvendo pelo menos duas gerações.
- Um ou mais CCRs diagnosticado(s) antes dos 50 anos de idade.

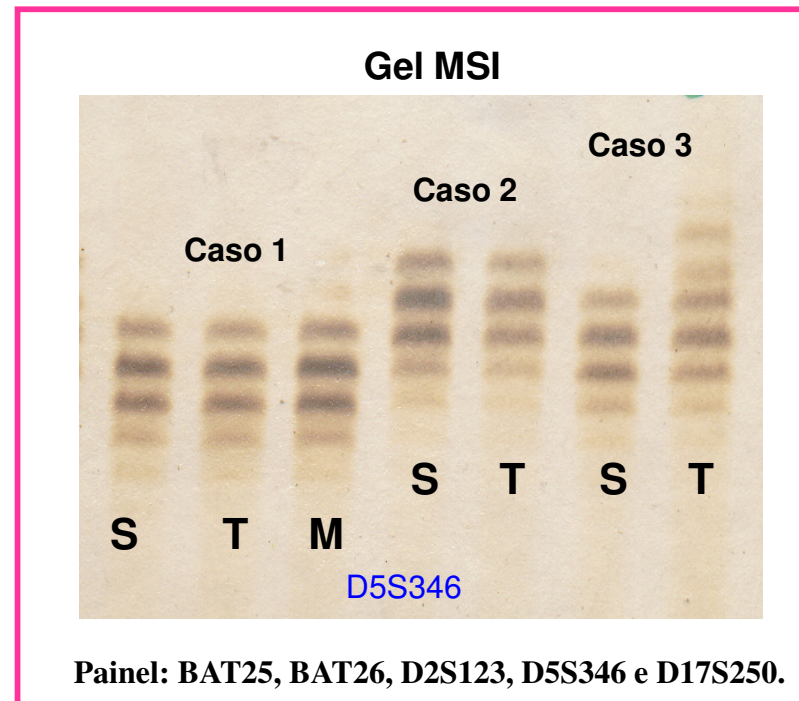
## **Crítérios de Bethesda**

Tumores de indivíduos que devem ser testados para instabilidade de microssatélites:

1. Com CCR ou com carcinoma do endométrio detetados antes dos 50 anos;
2. Com CCR síncrono ou mitocôndrico ou qualquer outro tipo de tumor do espectro HNPCC (estômago, ovário, pâncreas, ureteres, renal, pélvis,...) em qualquer idade;
3. Com CCR antes dos 60 anos de idade e histologia de MSI-H no tumor;
4. CCR num ou mais familiares em primeiro grau com tumores do espectro HNPCC e um dos tumores antes dos 50 anos;
5. CCR diagnosticado em dois ou mais familiares em primeiro grau com tumores do espectro HNPCC independentemente da idade.

## Instabilidade de microssatélites (MSI)

- No HNPCC foi descoberto que a instabilidade de microssatélites é o resultado de mutações em genes como o *hMSH2*, *hMLH1*, *hMSH6*, *hPMS1* e *hPMS2*.
- Alterações em sequências repetitivas simples de microssatélites relativamente ao tecido normal.
- Mutações tais como inserções ou deleções de unidades de repetição de um ou de vários microssatélites.





## Instabilidade de microssatélites (MSI)

Marcadores: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346 e D17S250

Sem instabilidade → não deve proceder à análise dos genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*

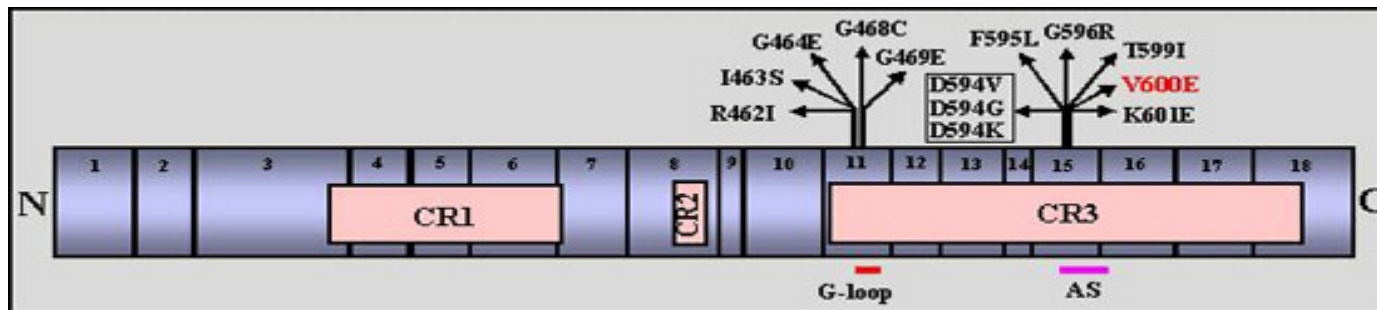
1 marcador alterado → **MSI Low** (baixa instabilidade)

>2 marcadores alterados → **MSI High** (alta instabilidade)



Proceder à pesquisa de mutações no gene ***BRAF***

Tumores com mutação germinal em *MSH2*, *MLH1* e *MSH6* não apresentam a mutação p.V600E.



***BRAF* negativo**



Proceder à pesquisa de mutações no genes *MLH1*, *MSH2* e *MSH6*

## Genes *Mismatch Repair System*

### *hMSH2*

Localiza-se no cromossoma 2 (2p22-p21)  
16 exões – 934 amino ácidos

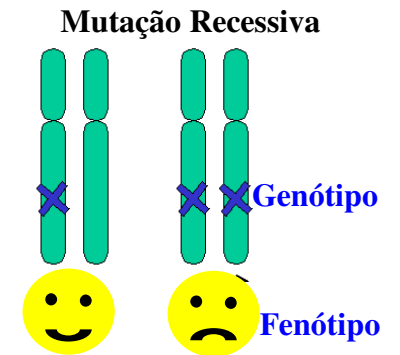


### *hMLH1*

Localiza-se no cromossoma 3 (3p21.3 )  
19 exões – 756 amino ácidos



# Cancro Colorectal Familiar



## 3. MAP (Polipose Adenomatosa Familiar por *MYH*)

- Doença autossómica recessiva;
- Geralmente <100 pólipos adenomatosos;
- S/ manifestações extracolónicas;
- 33% das famílias que não apresentam mutações germinais em *APC* apresentam mutações germinais no gene de reparação por BER, o *MYH*.

## Gene *MYH*

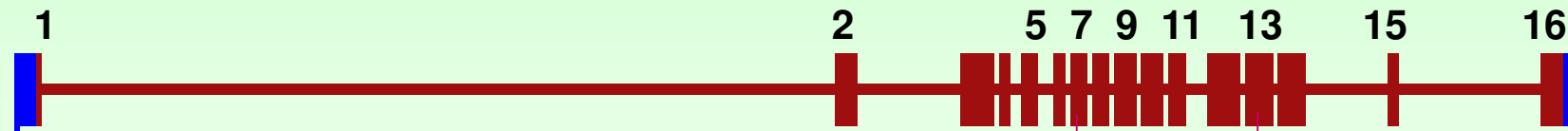
Gene do Sistema de Reparação por *BER*

Localiza-se no cromossoma 1 (1p34.3-p32.1)

16 exões - RNA mensageiro 7.1 kb

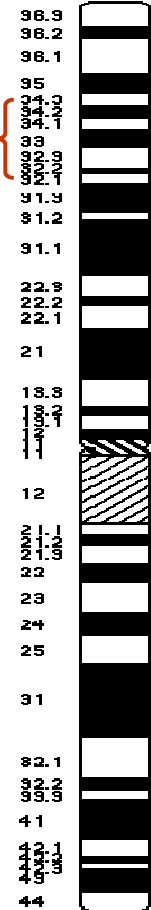
535 amino ácidos

Exão



p.Y165C

p.G382D



# Estratégia

## ➤ Identificar famílias em que ocorrem múltiplos casos de cancro colorectal

### 1. FAP/Múltiplos adenomas

Número de pólipos/adenomas

História familiar

### 2. HNPCC

#### **Critérios de Amesterdão**

- ✓ Três ou mais familiares com o diagnóstico histológico de CCR;
- ✓ CCR envolvendo pelo menos duas gerações, em que um elemento afectado é familiar em 1º grau dos outros dois;
- ✓ Um ou mais CCR diagnosticados antes dos 50 anos de idade.

#### **Não cumpre critérios de Amesterdão**

- ✓ Pesquisa de instabilidade de microssatélites (IMS ou *MSI*)
- ✓ Se *MSI* pesquisar mutações no gene *BRAF*

## Estratégia

- Pesquisar e caracterizar mutações germinais no caso índice (afectado)

FAP → *APC*

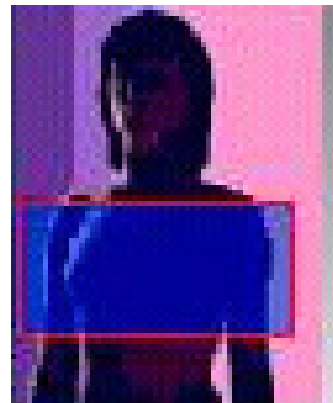
Múltiplos adenomas → *MYH*

HNPCC → Critérios completos → *hMSH2, hMLH1, hMSH6*

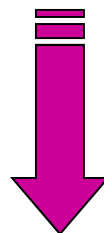
HNPCC → Critérios incompletos → MSI → positivo → BRAF negativo → *hMSH2, hMLH1, hMSH6*

- Oferecer diagnóstico genético pré-sintomático aos elementos das famílias com mutação identificada que desejem efetuar o estudo após aconselhamento genético e consentimento informado.

## Cancro da Mama Familiar



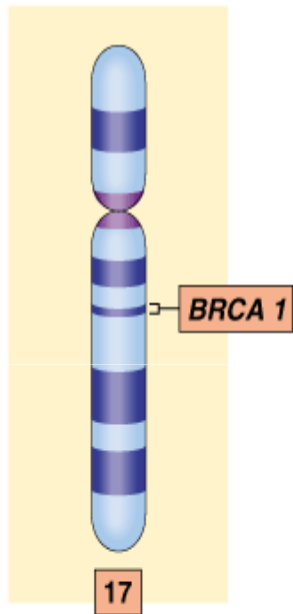
1:8 mulheres desenvolvem Cancro da Mama



5 – 10 % dos casos são hereditários

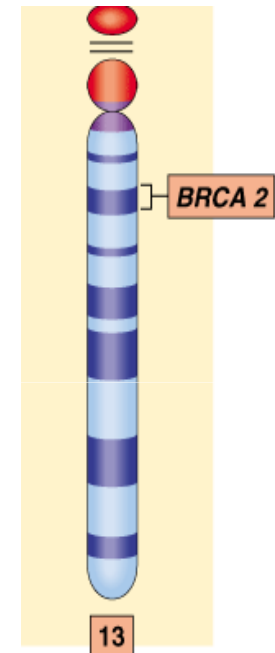


## Os Genes do cancro da mama familiar



**17q12-21**  
**24 exões (1863 aa)**

**13q12-13**  
**27 exões (3418 aa)**



- Genes supressores de tumor
- Transmissão autossómica dominante
- Elevada penetrância



**Possibilidade de rastreio de mutações germinais em doentes com história familiar**



## Estratégia

- Identificar famílias em que ocorrem múltiplos casos de cancro da mama e/ou de cancro da mama e do ovário;
- Pesquisar e caracterizar mutações germinais em BRCA1 e BRCA2 no caso índice (afectado);
- Oferecer diagnóstico genético pré-sintomático aos elementos das famílias com mutação identificada que desejem efetuar o estudo após consentimento informado.

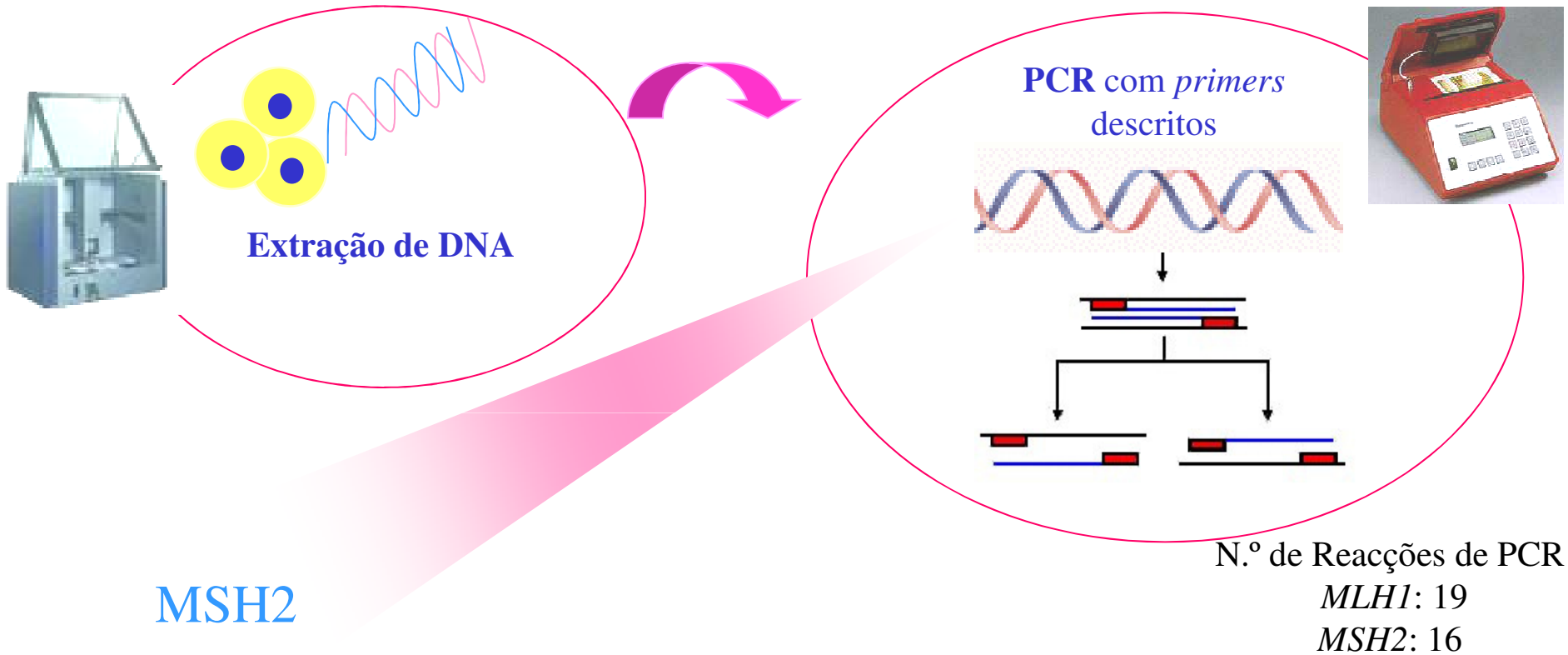
## Critérios de selecção adoptados para rastreio de mutações em BRCA1 e BRCA2 em famílias afectadas

- Famílias com 2 ou mais casos de cancro da mama sendo pelo menos 1 antes dos 50 anos (ou apenas 1 caso bilateral)
- Famílias com cancro da mama e do ovário (2 casos de cancro do ovário e cancro da mama, grupo de maior risco)
- Famílias com pelo menos 1 caso de cancro da mama no homem

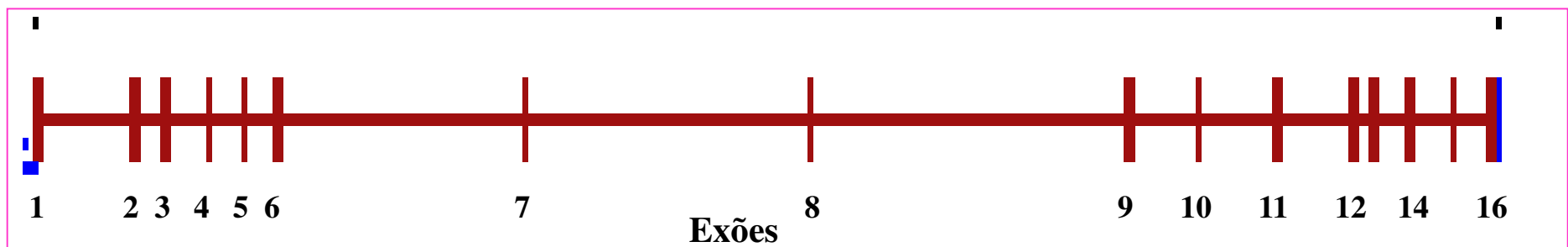
### Grupos em que raramente se encontram mutações:

- Famílias com 2 ou mais casos de cancro da mama, todos com mais de 50 anos
- Famílias com 1 caso de cancro da mama com menos de 35 anos ou 1 caso de cancro do ovário com menos de 40 anos

# MÉTODOS

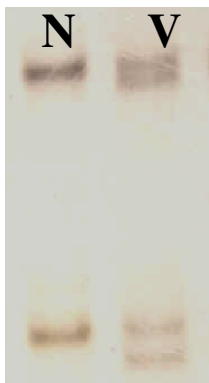


**MSH2**

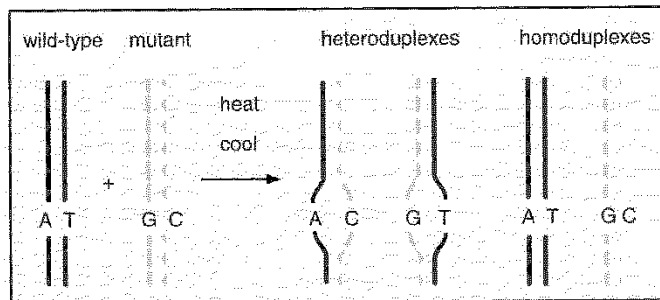


# METODOS

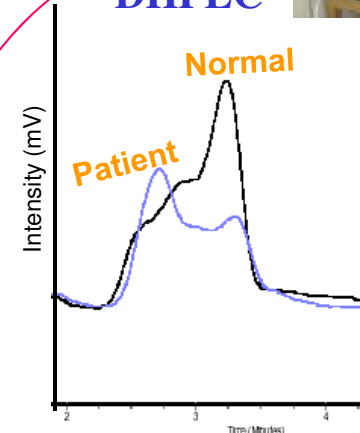
## SSCP



Gel a 6% Corado com nitrato de prata



## DHPLC



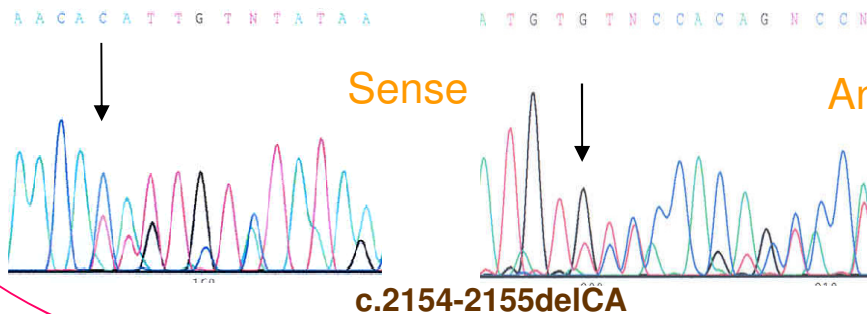
62 °C, gradiente linear 52% - 60 % B, 4 min



## SEQUENCIAÇÃO

Padrão anormal

Padrão anormal



# MÉTODOS

# PESQUISA DE GRANDES DELECCÕES (MSH2 E MLH1)



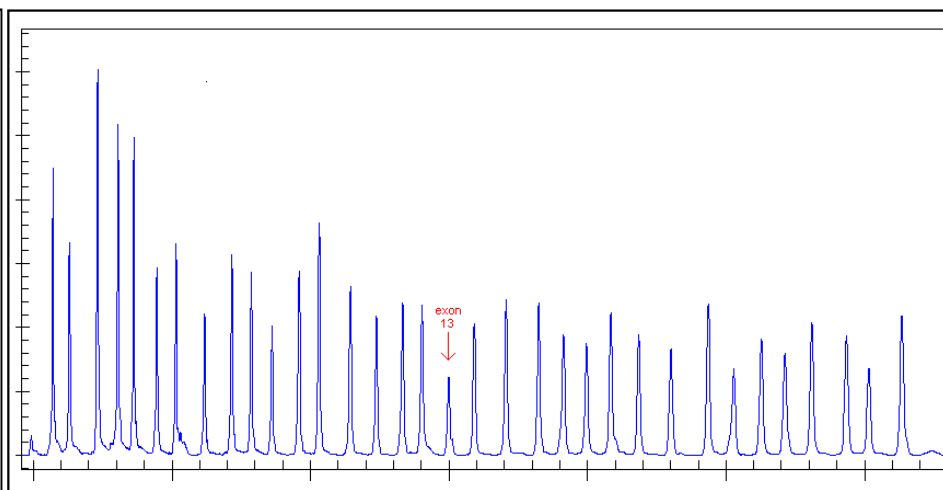
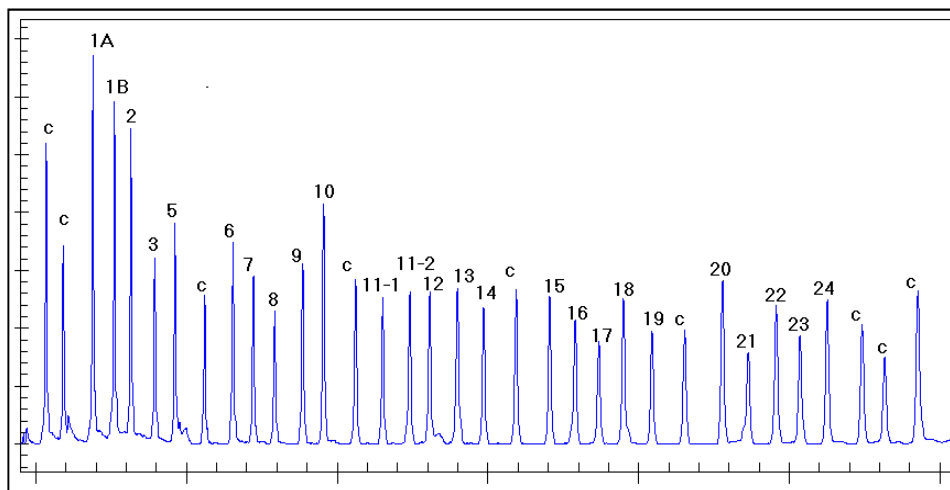
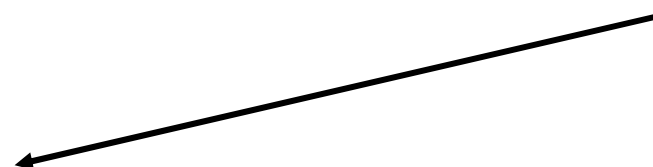
Extracção DNA



PCR com kit MLPA



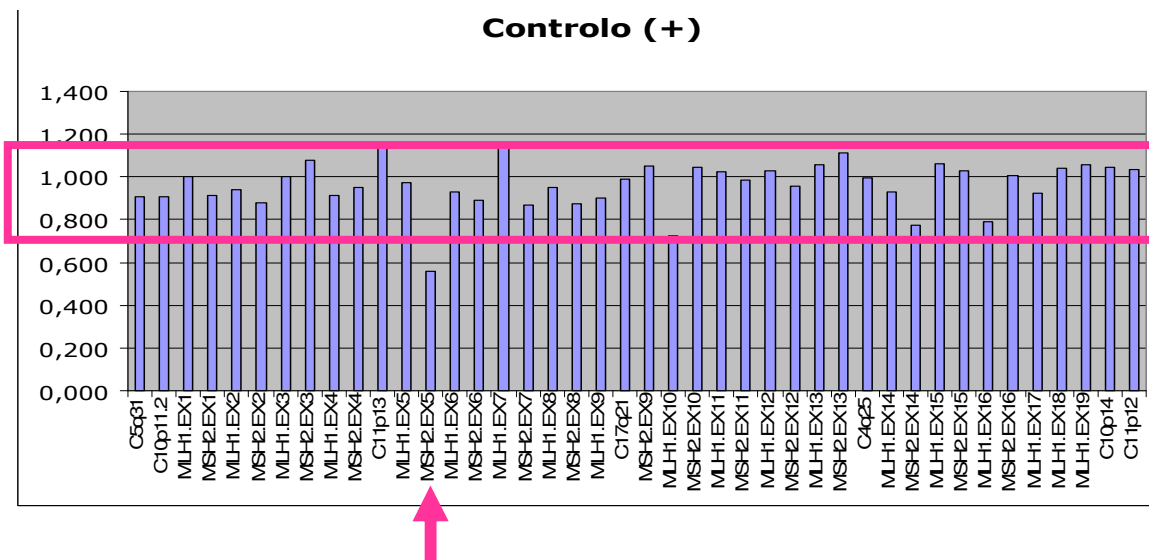
Análise *genescan*



# MÉTODOS

# PESQUISA DE GRANDES DELEÇÕES (MSH2 E MLH1)

Patient		Control			Ave	SD	C5q31	C10p11.2	C11p13	C17q21	C4q25	C10p14	C11p12
Contolo +	Height	Panel	Height										
Category	Height	Category	Height										
C5q31	1176	C5q31	723,7	C5q31	0,909	0,077	1,000	1,002	0,784	0,918	0,911	0,867	0,880
C10p11.2	993	C10p11.2	612,5	C10p11.2	0,907	0,076	0,998	1,000	0,783	0,916	0,909	0,865	0,878
MLH1.EX1	1258	MLH1.EX1	703,2	MLH1.EX1	1,001	0,084	1,101	1,103	0,863	1,011	1,003	0,955	0,968
MSH2.EX1	1297	MSH2.EX1	796,7	MSH2.EX1	0,911	0,077	1,002	1,004	0,786	0,920	0,912	0,869	0,881
MLH1.EX2	1029	MLH1.EX2	610	MLH1.EX2	0,943	0,080	1,038	1,040	0,814	0,953	0,945	0,900	0,913
MSH2.EX2	747	MSH2.EX2	474,7	MSH2.EX2	0,880	0,074	0,968	0,971	0,759	0,889	0,882	0,840	0,852
MLH1.EX3	1087	MLH1.EX3	606,8	MLH1.EX3	1,002	0,084	1,102	1,105	0,865	1,012	1,004	0,956	0,970
MSH2.EX3	1490	MSH2.EX3	772,3	MSH2.EX3	1,079	0,091	1,187	1,190	0,931	1,090	1,081	1,030	1,044
MLH1.EX4	1082	MLH1.EX4	662,2	MLH1.EX4	0,914	0,077	1,005	1,008	0,789	0,923	0,916	0,872	0,885
MSH2.EX4	1424	MSH2.EX4	838,5	MSH2.EX4	0,950	0,080	1,045	1,048	0,820	0,959	0,952	0,906	0,919
C11p13	851	C11p13	410,7	C11p13	1,159	0,098	1,275	1,278	1,000	1,170	1,161	1,106	1,122
MLH1.EX5	1130	MLH1.EX5	647,4	MLH1.EX5	0,976	0,082	1,074	1,077	0,842	0,986	0,978	0,932	0,945
MSH2.EX5	529	MSH2.EX5	531,2	MSH2.EX5	0,557	0,047	0,613	0,614	0,481	0,563	0,558	0,532	0,539
MLH1.EX6	1015	MLH1.EX6	610,5	MLH1.EX6	0,930	0,078	1,023	1,025	0,802	0,939	0,932	0,887	0,900
MSH2.EX6	1005	MSH2.EX6	630,4	MSH2.EX6	0,892	0,075	0,981	0,983	0,769	0,901	0,893	0,851	0,863
MLH1.EX7	1377	MLH1.EX7	676,8	MLH1.EX7	1,138	0,096	1,252	1,255	0,982	1,149	1,140	1,086	1,101



Sempre que possível confirmar por sequenciação

## DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES

### 1 - Nomenclatura

De acordo com <http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>.

**c.2729\_2731delAGCinsTTTAG**  
**p.Gln910LeufsX1**

↓

cDNA: 2718	AAG TTA AAA CAG CTA AAA GCT GAA GTA ATA	2748
Proteína: 907	Lys Leu Lys Gln Leu Lys Ala Glu Val Ile	916
<p><b>c.</b> Descrição a nível do cDNA  <b>p.</b> Descrição a nível da proteína  <b>g.</b> Descrição a nível do genoma</p>		
↓		
del AGC Ins TTTAG	<p style="color: magenta;">AAG TTA AAA CAG CTA AAA GCT GAA GTA ATA</p> <p style="color: magenta;">AAG TTA AAA CTT TAG AGC TGA AGT AAT A</p> <p style="color: red; font-weight: bold;">Codão Stop → proteína truncada</p>	2748

## DESCRIÇÃO DAS MUTAÇÕES

### 2 - Tipo de mutações

- *Nonsense* por substituição

c.1201C>T

p.Leu90X

CAG → TAG

Leu → Codão Stop → proteína truncada

(Patogénica → associada ao fenótipo)

- *Nonsense* por deleção /inserção levando a *frameshift*

c.2729\_2731delIAGCinsTTTAG      deleção e inserção

p.Gln910LeufsX1

fora da grelha de leitura → Codão stop → proteína truncada

(Patogénica → associada ao fenótipo)

- *Splicing*

c.668+1G>A

*Splicing* incorrecto que pode levar também a uma proteína truncada

(Patogénica → associada ao fenótipo)

- *Missense*

c.1940C>G

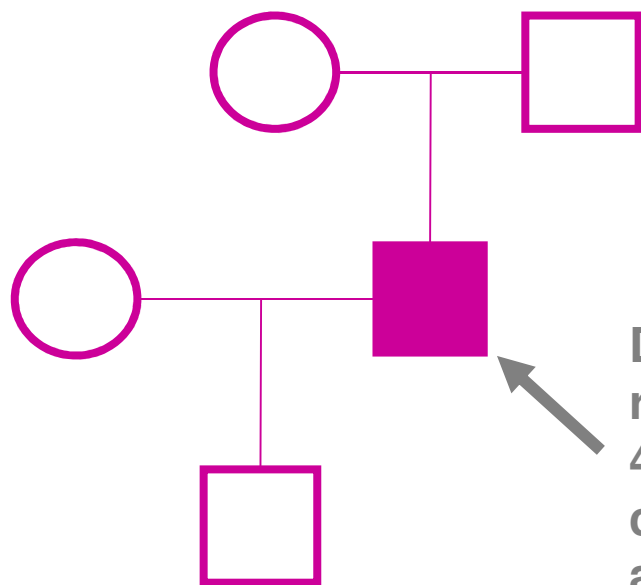
p.R640G

(Patogénica ????)

- a) Pesquisar em 100 cromossomas de indivíduos controlo;
- b) Carga do grupo R do amino ácido;
- c) Segregação com a doença na família;
- d) Conservação do amino ácido na evolução das espécies;
- e) Estudos de mRNA.



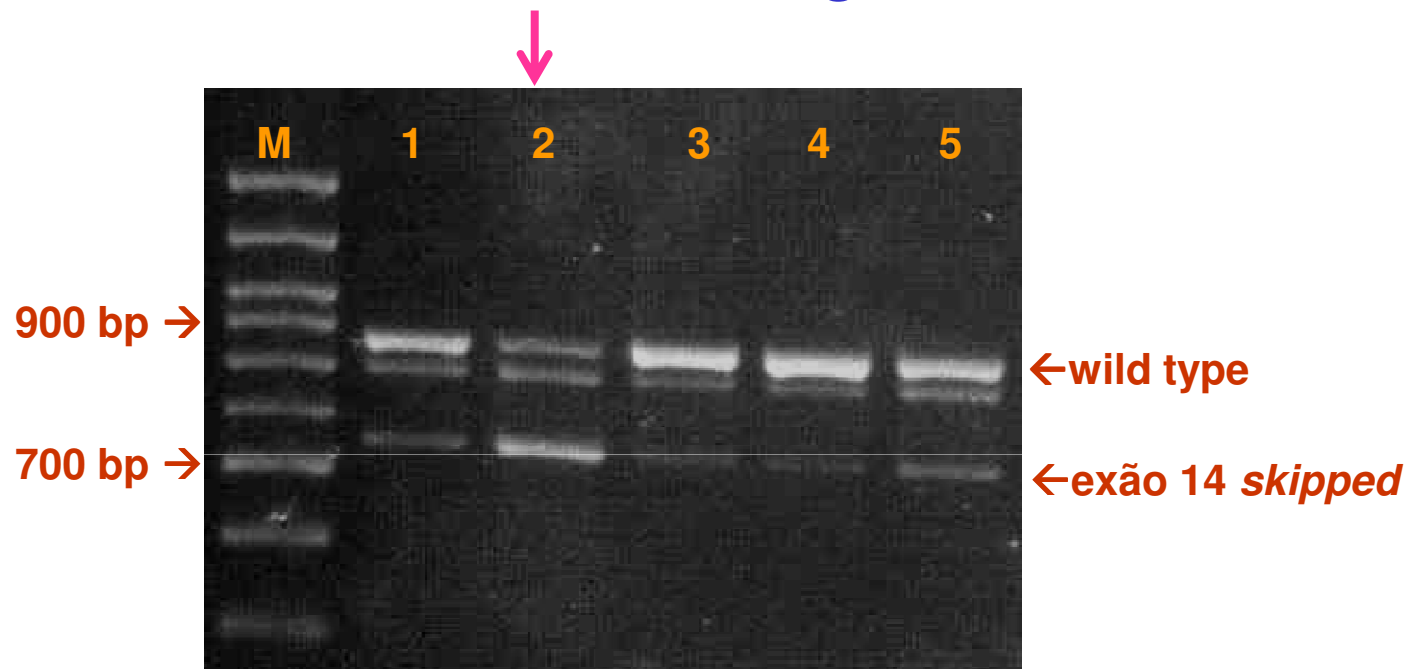
## Caso da consulta de genética



Doente com fenótipo clássico de FAP, a colonoscopia revelou mais de 100 pólipos. Fez colectomia total aos 46 anos. Todos os pólipos analisados foram classificados como tubulares e tubulares-vilosos sem alto grau de displasia.

A pesquisa de mutações no gene APC revelou uma mutação *missense* **c.1918C>G (p.R640G)**

## Caso da consulta de genética



**Gel de agarose mostrando os produtos amplificados do RT-PCR do gene APC entre os exões 13 e 15 utilizando RNA total de indivíduos controlo (linhas 1, 3, 4 e 5) e do doente com FAP portador da mutação c.1918C>G (p.R640G) (linha 2)**

(A sequenciação da banda de 800 bp revelou tratar-se de um produto de PCR inespecífico)

## 1º Passo: Identificar mutação familiar responsável pelo fenótipo



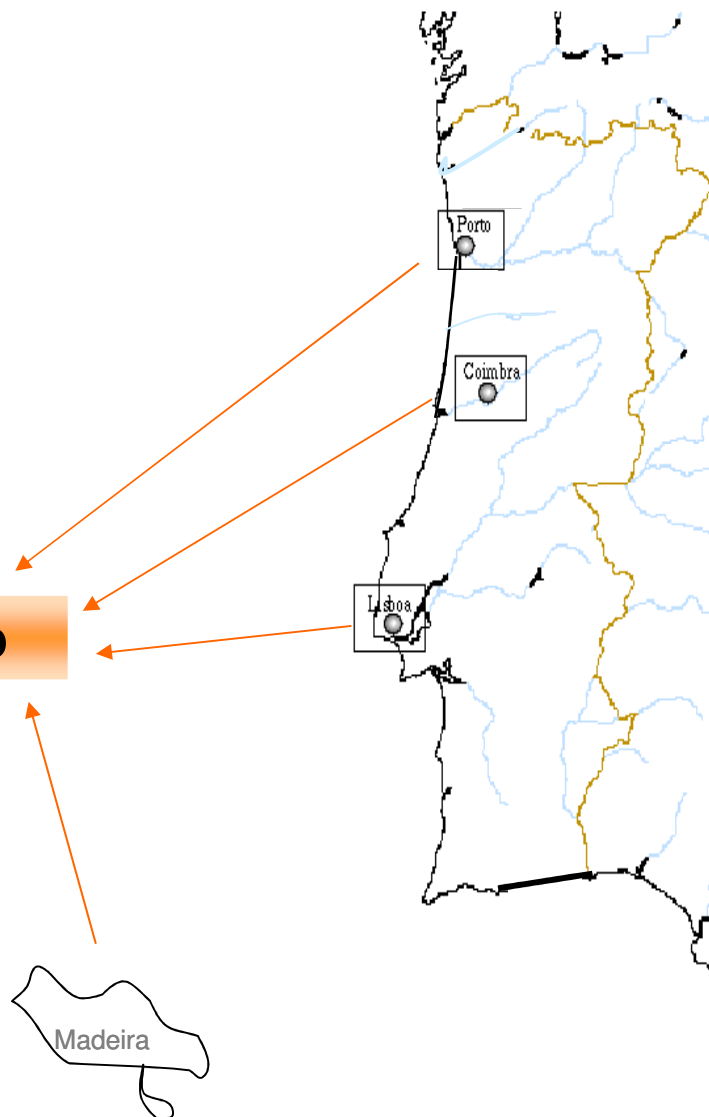
## 2º Passo: Teste pré-sintomático

Através do **aconselhamento genético** e consentimento informado poderão agora todos os familiares (descendentes e colaterais) optar pelo teste **pré-sintomático**.

## Experiência na Pesquisa de Mutações em Cancro Colorectal Familiar (Desde 1997- até 2009)

**Gastrenterologistas**  
**Enfermeiras**  
**Cirurgiões**  
**Patologistas**  
**Geneticistas**  
**Biólogos**

**Laboratório**



- 129 doentes registrados como FAP;
- 73 doentes registrados como HNPCC;

- 66 indivíduos (51%) → Mutação no gene APC
- 35 (12.8%) → Mutação no genes hMSH2 ou hMLH1

**227 Testes pré-sintomáticos:**

**82 portadores**

**145 não portadores**

- **60 doentes com polipose**  
(Sem mutação germinal no gene APC)

21

Indivíduos apresentam mutação germinal no gene MYH (33.3%);

#### 4 novas mutações:

p.E396fsX437 → Stop codon

p.Y114H

p.R168H

p.R227W

Não foram encontradas em 50 indivíduos saudáveis;

Localizam-se numa região bem conservada do gene;

Polaridade do amino ácido é alterada.

## Produção Científica na Pesquisa de Mutações em Cancro Colorectal Familiar (1997-2009)

- ✓ **13 artigos científicos (11 em revistas internacionais)**
- ✓ **5 prémios**
- ✓ **27 comunicações em forma de *poster***
- ✓ **9 comunicações orais**

**OBRIGADA !**